



**Nayara Araújo Cardoso  
Renan Rhonalty Rocha  
Maria Vitória Laurindo  
(Organizadores)**

**As Ciências Biológicas e da  
Saúde na Contemporaneidade 2**

**Atena**  
Editora  
Ano 2019

Nayara Araújo Cardoso  
Renan Rhonaly Rocha  
Maria Vitória Laurindo  
(Organizadores)

# As Ciências Biológicas e da Saúde na Contemporaneidade 2

Atena Editora  
2019

2019 by Atena Editora

Copyright © da Atena Editora

**Editora Chefe:** Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

**Diagramação e Edição de Arte:** Natália Sandrini e Lorena Prestes

**Revisão:** Os autores

### Conselho Editorial

- Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília  
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa  
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista  
Profª Drª Deusilene Souza Vieira Dall’Acqua – Universidade Federal de Rondônia  
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria  
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice  
Profª Drª Juliane Sant’Ana Bento – Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense  
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão  
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará  
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista  
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas  
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande  
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

#### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

C569 As ciências biológicas e da saúde na contemporaneidade 2 [recurso eletrônico] / Organizadores Nayara Araújo Cardoso, Renan Rhonalty Rocha, Maria Vitória Laurindo. – Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2019. – (As Ciências Biológicas e da Saúde na Contemporaneidade; v. 2)

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: World Wide Web.

Inclui bibliografia

ISBN 978-85-7247-216-6

DOI 10.22533/at.ed.166192803

1. Ciências biológicas. 2. Biologia – Pesquisa – Brasil. 3. Saúde – Brasil. I. Cardoso, Nayara Araújo. II. Rocha, Renan Rhonalty. III. Laurindo, Maria Vitória. IV. Série.

CDD 574

**Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422**

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores.

2019

Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

## APRESENTAÇÃO

A obra “As Ciências Biológicas e da Saúde na Contemporaneidade” consiste de uma série de livros de publicação da Atena Editora, em seus 22 capítulos do volume II, apresenta a importância do desenvolvimento de novas pesquisas nos âmbitos da saúde e da natureza e ainda a relevância da busca de novas terapias para o tratamento de variadas patologias.

O desenvolvimento de pesquisas no campo da saúde representa uma ferramenta importante para a busca de novas estratégias para o diagnóstico, acompanhamento do curso e tratamento de doenças. É na área da saúde que a biotecnologia encontra algumas de suas aplicações mais benéficas e abrangentes. Por meio de diferentes vertentes biotecnológicas, como a produção e atuação de organismos geneticamente modificados; a engenharia genética, que permite qualquer tipo de alteração em nível de DNA e experimentos empregando espécies vegetais e/ou compostos isolados para o desenvolvimento de terapias alternativas e aprimoramento das terapias convencionais.

Atualmente a busca por novos compostos com atividade terapêutica é feita majoritariamente através da experimentação de produtos naturais, uma vez que muitos destes têm comprovadas cientificamente suas propriedades antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias, antineoplásicas, analgésicas, entre outras.

Desse modo, este volume II apresenta artigos que tratam: das propriedades antioxidantes de espécies vegetais como o alecrim e o chá verde; estudos microbiológicos e de toxicidade de espécies vegetais e animais; caracterização de ácidos nucleicos e proteínas; emprego da engenharia genética para elucidação de mecanismos de ação e desenvolvimento e experimentação de alimentos funcionais. Assim, esta obra é dedicada aos pesquisadores da área de saúde, que buscam reciclar seus conhecimentos por meio de pesquisas relevantes e se atualizar perante às novas tecnologias e descobertas científicas e biotecnológicas aplicadas às áreas da saúde.

Portanto, esperamos que este livro possa estimular outros estudantes e profissionais de saúde ao desenvolvimento de pesquisas e estudos a fim de incorporar à literatura referências atualizadas e possibilitar a aplicabilidade dos resultados dessas pesquisas às práticas profissionais diárias.

Nayara Araújo Cardoso  
Renan Rhonalty Rocha  
Maria Vitória Laurindo

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
A BIOLOGIA SINTÉTICA E ENGENHARIA METABÓLICA PARA DESENVOLVIMENTO DE SOLUÇÕES EM BIOTECNOLOGIA	
Mauricio Schiavo Gabriel Dall'Alba Mauricio Moura da Silveira Sergio Echeverrigaray	
<b>DOI 10.22533/at.ed.1661928031</b>	
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>18</b>
A CONSTRUÇÃO DE MODELOS DIDÁTICOS DA ESTRUTURA DO DNA COM MATERIAIS ALTERNATIVOS: CRIANDO E APRENDENDO	
Maria da Conceição dos Reis Leal João Gabriel Rangel Gonçalves	
<b>DOI 10.22533/at.ed.1661928032</b>	
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>28</b>
ALECRIM ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.): EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES E SUA IMPORTÂNCIA NO CONTROLE DA DOENÇA MANCHA FOLIAR EM PLANTAS DE CEVADA	
Fernando Luquis Brenda Mery Santos de Godoy Cristiane Santana Garcia Victor Alves Franklin Luciana Leite Oliveira Nilsa Sumie Yamashita Wadt Vinicius de Oliveira Cardoso Erna Elisabeth Bach	
<b>DOI 10.22533/at.ed.1661928033</b>	
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>37</b>
ALELOPATIA DE EXTRATOS AQUOSOS DE <i>Eragrostis lugens</i> Nees. NA GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE <i>Oryza sativa</i> L	
Daniela Sponchiado Jéssica Cezar Cassol Douglas de Lima Righi Lucas Menezes Jorge Eduarda Mena Barreto Juçara Terezinha Paranhos	
<b>DOI 10.22533/at.ed.1661928034</b>	

**CAPÍTULO 5 ..... 45**

AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DE *COMBRETUM LEPROSUM MART.*: TESTE *ALLIUM CEPA*

Raidan Costa Rodrigues  
Valéria Moura de Carvalho  
Jadielson da Silva Santos  
Brenda Lois Barros dos Santos  
Andressa Jordanne Pereira Ramos  
Cairo Hilbert Santos de Melo  
Juliane Moreira Ramos  
Elizângela de Carvalho Nunes  
Sâmya Katya Barros Guimarães  
Wanderson Ferreira Martins  
Adão Correia Maia  
Kelly Maria Rêgo da Silva  
Mateus Sávio Amorim  
Antonio Lima Braga

**DOI 10.22533/at.ed.1661928035**

**CAPÍTULO 6 ..... 50**

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE ALECRIM (*ROSMARINUS OFFICINALIS*) E CHÁ VERDE (*CARMELLIA SINENSIS*) EM LINGUIÇAS FRESCAL BOVINA

Thaísia Cidarta Melo Barbosa  
Juliana Nobrega Clemente  
Karina da Silva Chaves  
Sthelio Braga da Fonseca  
Bruno Raniere Lins de Albuquerque Meireles

**DOI 10.22533/at.ed.1661928036**

**CAPÍTULO 7 ..... 61**

AVALIAÇÃO DO USO DE AÇÚCAR NA TERAPIA TÓPICA DE FERIDAS

Ingrid dos Santos Farias  
Emanuelle Karine Frota Batista  
Hebelys Ibiapina da Trindade  
Janayna Batista Barbosa de Sousa Muller  
Maria José Lima Nascimento  
Evanita da Rocha Luz  
Maria do Carmo de Souza Batista

**DOI 10.22533/at.ed.1661928037**

**CAPÍTULO 8 ..... 71**

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA VITAMINA C SOBRE A DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA NA FASE AGUDA DA DOENÇA DE CHAGAS EM CAMUNDONGOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM A CEPA QM2 DE *Trypanosoma cruzi*

Patrícia Milani de Moraes  
Bruna de Lima Pereira  
Ludmyla Toller Cocco  
Luciamare Perinetti Alves Martins

**DOI 10.22533/at.ed.1661928038**

**CAPÍTULO 9 ..... 84**

AValiação DOS ÍndICES DE REGENERAÇÃO HEPÁTICA NO MODELO EXPERIMENTAL DE HEPATECTOMIA A 70%

Luz Marina Gonçalves de Araujo Oliveira

Pedro Luiz Squilacci Leme

Maria Cristina Chavantes

**DOI 10.22533/at.ed.1661928039**

**CAPÍTULO 10 ..... 94**

BIOTECNOLOGIA NO CONTROLE DE MOSQUITOS TRANSMISSORES DE ARBOVIROSES: BIOENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA EM MOSQUITOS ADULTOS

Fabíola da Cruz Nunes

Louise Helena Guimarães de Oliveira

Patrícia Alexandria Paiva Silva de Sousa

Hyago Luiz Rique

**DOI 10.22533/at.ed.16619280310**

**CAPÍTULO 11 ..... 103**

COMPOSTOS BIOATIVOS E POTENCIAL NUTRACÊUTICO DO FRUTO DE BURITI (*Mauritia flexuosa* L) NA TERAPIA COADJUVANTE EM PORTADORES DE DISLIPIDEMIA

Joilane Alves Pereira-Freire

Vivianne Rodrigues Amorim

Fernanda Maria de Carvalho Ribeiro

Stella Regina Arcanjo Medeiros

Jurandy do Nascimento Silva

Paulo Michel Pinheiro Ferreira

**DOI 10.22533/at.ed.16619280311**

**CAPÍTULO 12 ..... 116**

DESENVOLVIMENTO DE MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO PARA IMOBILIZAÇÃO DE *Chlorella vulgaris*

Felipe de Albuquerque Santos

Eduardo Bittencourt Sydney

Alessandra Cristine Novak Sydney

**DOI 10.22533/at.ed.16619280312**

**CAPÍTULO 13 ..... 127**

DESENVOLVIMENTO DE PÃO DE FORMA CONTENDO FARINHA MISTA DE MARACUJÁ E JABUTICABA

Jamilly Salustiano Ferreira Constantino

Julice Dutra Lopes

**DOI 10.22533/at.ed.16619280313**

**CAPÍTULO 14 ..... 143**

DETERMINAÇÃO DO EHL (EQUILÍBRIO-HIDROFÍLICO LIPOFÍLICO) DO ÓLEO DE ABACATE

Laíssa Aparecida Praxedes dos Reis

Alessandra Cristine Novak Sydney

**DOI 10.22533/at.ed.16619280314**

**CAPÍTULO 15 ..... 150**

ESTUDO DA TOXICIDADE DE *Combretum leprosum* Mart.: TESTE *ALLIUM CEPA*

Valéria Moura de Carvalho  
Raidan Costa Rodrigues  
**Kelly Maria Rêgo da Silva**  
Elizângela de Carvalho Nunes  
Sâmya Katya Barros Guimarães  
Brenda Lois Barros dos Santos  
Cairo Hilbert Santos de Melo  
Juliane Moreira Ramos  
Wanderson Ferreira Martins  
Gabrielle Costa Bento Campos  
Adão Correia Maia  
Antonio Lima Braga  
Jadielson dos Santos

**DOI 10.22533/at.ed.16619280315**

**CAPÍTULO 16 ..... 155**

ESTUDO E MODELAGEM CINÉTICA HETEROGÊNEA DA REAÇÃO DE CETALIZAÇÃO DO GLICEROL COM ACETONA UTILIZANDO ZEÓLITAS DO TIPO H-BEA E H-FER COMO CATALISADORES

Vinicius Rossa  
Gisel Chenard Díaz  
Yordanka Reyes Cruz  
Sibele Berenice Castellã Pergher  
Donato Alexandre Gomes Aranda

**DOI 10.22533/at.ed.16619280316**

**CAPÍTULO 17 ..... 171**

ESTUDOS MICROBIOLÓGICOS DAS FOLHAS DA *Eugenia uniflora* Linn. (PITANGA)

Giovanna Gabrielly Alves da Silva Fraga  
Maria Gabrielle de Oliveira Tabosa  
Emilay Lira de Freitas  
Leticia Vieira dos Santos Beserra  
Arquimedes Fernandes Monteiro de Melo  
Risonildo Pereira Cordeiro

**DOI 10.22533/at.ed.16619280317**

**CAPÍTULO 18 ..... 177**

NEW PROCESS FOR OBTAINING NANOCHITOSAN / BURITI OIL (*Mauritia flexuosa*) BIOCOMPOSITE: A BIOMATERIAL FOR REGENERATIVE MEDICINE AND TISSUE ENGINEERING

Júlia Silveira Broquá  
Luciano Pighinelli  
Magda Comoretto Gall  
Jader Figueiredo  
Giovani André Piva  
Lucas Eduardo Lopes  
Machado, Pamela Persson  
Anderson Rockenbach  
Renata Pospichil  
Luan Rios Paz  
Fernando Guimarães  
Gabrielle Zanin  
Marzena Kmiec Pighinelli

**DOI 10.22533/at.ed.16619280318**

**CAPÍTULO 19 ..... 192**

*PORPHYROMONAS GINGIVALIS* NA PERIODONTITE: POR QUE ESTUDAR SEUS FATORES DE VIRULÊNCIA COM FERRAMENTAS *IN SILICO*?

Ellen Karla Nobre dos Santos-Lima  
Larissa de Mattos Oliveira  
Michelle Miranda Lopes Falcão  
Manoelito Coelho dos Santos Junior  
Márcia Tosta Xavier  
Soraya Castro Trindade

**DOI 10.22533/at.ed.16619280319**

**CAPÍTULO 20 ..... 211**

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOSURFACTANTES PRODUZIDOS POR *Bacillus subtilis* A PARTIR DO EXTRATO AQUOSO DA ALGAROBA [*Prosopis juliflora* (SW) DC] COMO SUBSTRATO NÃO CONVENCIONAL

Adrielly Silva Albuquerque de Andrade  
Emanuele Cardoso Dias  
Napoleão José de Oliveira Neto  
Graciana Clécia Dantas  
Adna Cristina Barbosa de Sousa  
Andréa Farias de Almeida

**DOI 10.22533/at.ed.16619280320**

**CAPÍTULO 21 ..... 224**

SUPLEMENTAÇÃO COM DIFERENTES NUTRACÊUTICOS ATENUA PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS CARACTERÍSTICOS DO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

Ana Olívia Martins Laurentino  
Naiana da Rosa  
Tamires Mateus Gomes  
Eduardo de Medeiros Peretti  
Fabiana Durante de Medeiros  
Jucélia Jeremias Fortunato

**DOI 10.22533/at.ed.16619280321**

**CAPÍTULO 22 ..... 231**

USO DO EXTRATO DE *Ganoderma lucidum* NO CONTROLE DA MANCHA FOLIAR EM PLANTAS DE CEVADA PROTEGENDO O MEIO AMBIENTE

Ricardo Zanirato da Costa Fernandes  
Lorena de Cássia Barboza Pires  
Jessica Pojato da Silva  
Joseanne Meira Cambuí  
Edgar Matias Bach Hi  
Vinicius de Oliveira Cardoso  
Erna Elisabeth Bach

**DOI 10.22533/at.ed.16619280322**

**SOBRE OS ORGANIZADORES..... 239**

## A BIOLOGIA SINTÉTICA E ENGENHARIA METABÓLICA PARA DESENVOLVIMENTO DE SOLUÇÕES EM BIOTECNOLOGIA

### **Mauricio Schiavo**

Fundação Universidade de Caxias do Sul,  
Laboratório de biotecnologia e microbiologia  
aplicada, Caxias do Sul - Rio Grande do Sul

### **Gabriel Dall'Alba**

Fundação Universidade de Caxias do Sul, Núcleo  
de Pesquisa em Bioinformática, Caxias do Sul -  
Rio Grande do Sul

### **Mauricio Moura da Silveira**

Fundação Universidade de Caxias do Sul,  
Laboratório de bioprocessos, Caxias do Sul - Rio  
Grande do Sul

### **Sergio Echeverrigaray**

Fundação Universidade de Caxias do Sul,  
Laboratório de biotecnologia e microbiologia  
aplicada, Caxias do Sul - Rio Grande do Sul

**RESUMO:** Os avanços na biologia molecular, bioinformática, biologia de sistemas e no estudo de genômica, proteômica e metabolômica levaram ao desenvolvimento de duas áreas tecnológicas com potencial para revolucionar a biotecnologia como um todo. Ambas as áreas, a biologia sintética e a engenharia metabólica vem sendo desenvolvidas e aplicadas para solução de diversos problemas, alguns exemplos sendo: na redução dos custos de produção de compostos químicos de maior valor agregado em biorrefinarias, reduzindo o impacto ambiental e possibilitando a criação de sistemas renováveis para obtenção destes variados compostos; na

indústria farmacêutica, com a possibilidade de modificar vias metabólicas pouco produtivas de compostos de interesse no desenvolvimento de fármacos e a utilização de diferentes organismos para expressão de novas vias metabólicas; na medicina, sendo a biologia sintética aplicada no desenvolvimento de terapias gênicas e no combate de agentes etiológicos biológicos como vírus e microrganismos patológicos; na indústria de alimentos, sendo que a biologia sintética e a engenharia metabólica são aplicadas em microrganismos para obtenção de flavorizantes, aromatizantes e diferentes micro e macro nutrientes; no desenvolvimento de novas soluções industriais e outras aplicações de organismos *chassis* que envolvam detecção e sinalização, purificação e extração e modificação enzimática de diferentes compostos químicos. Outras aplicações destas tecnologias poderão influenciar em várias questões diárias e trazer soluções em campos ainda não explorados. Neste trabalho visamos organizar os pontos relevantes recentes na biologia sintética e engenharia metabólica, com exemplos de aplicações destas tecnologias no mundo acadêmico e no setor produtivo, discutindo o presente, e a prospecção futura de estado da arte destas tecnologias e as mudanças de paradigma que podem trazer para a sociedade. Este trabalho também pode servir de inspiração no desenvolvimento de novas combinações de

*biobricks* e de novos sistemas baseados em engenharia metabólica e biologia sintética.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biologia sintética, Engenharia metabólica, *biobricks*

**ABSTRACT:** Advances in molecular biology, bioinformatics, systems biology and the study of genomics, proteomics, and metabolomics have led to the development of two technological areas with the potential to revolutionize biotechnology as a whole. Both areas, synthetic biology, and metabolic engineering have been developed and applied to solve several problems, some examples being: reducing the production costs of higher value-added chemical compounds in biorefineries, diminishing environmental impact and enabling the creation of renewable systems to obtain these various compounds; in the pharmaceutical industry, with the possibility of modifying poorly productive metabolic pathways of compounds of interest in the development of drugs and the use of different organisms to express new metabolic pathways; in medicine, in the development of gene therapies and in the efforts to uphold against biological etiological agents such as viruses and microorganisms; in the food industry to modify microorganisms to obtain additives, flavorings and different micro and macronutrients; in the development of new industrial solutions and other applications of chassis organisms involving detection and signaling, purification and extraction and enzymatic modification of chemicals and peptides of interest. Other applications of these technologies may influence many daily issues and bring solutions in fields not yet explored. In this work we aim to organize the relevant aspects of synthetic biology and metabolic engineering, with examples of applications of these technologies by the academic community and the productive sector, discussing the present, and future state-of-the-art exploration of these technologies and paradigm shifts that they may bring to society. This work can also be an inspiration for the development of new combinations of *biobricks* and new systems based on metabolic engineering and synthetic biology.

**KEYWORDS:** Synthetic biology, metabolic engineering, *biobricks*

## BIOLOGIA SINTÉTICA

A biologia sintética é um novo termo para uma ideia antiga. Em seu livro de 1912, *The Mechanistic Conception of Life*, o biólogo alemão-americano Jacques Loeb propôs que os organismos vivos fossem considerados a partir de uma perspectiva de engenharia - não apenas como entidades “projetadas” pela evolução, mas como dispositivos passíveis de intervenção humana, manipulação e alteração (BALL, 2018).

Essa foi uma visão nascida em parte por pura ingenuidade. De onde vinha a vitalidade da vida havia sido um profundo mistério para os cientistas, mas apenas nas décadas seguintes à proposta de Loeb é que os biólogos começaram a perceber que as origens surgiam da capacidade da matéria viva de se organizar em escalas microscópicas. E essa organização se mostrou incrivelmente complicada (BALL, 2018).

As esperanças de total compreensão dos mecanismos de herança e controle

genéticos, para levar a compreensão das células e os organismos em termos de sua maquinaria molecular, deram lugar a uma apreciação da complexidade desconcertante dos sistemas vivos (BALL, 2018).

Entretanto, mesmo com os desafios ainda existentes, é possível intervir na genética de maneiras que às vezes são previsíveis. Entende-se muito sobre como os genes tendem a funcionar em redes, regulando a atividade uns dos outros para direcionar o destino da célula. Essa análise dos genomas em termos de redes funcionais envolvendo *feedback*, *switching* e amplificação é aquela que soa familiar aos engenheiros. (BALL, 2018).

Dessa forma, a biologia sintética se caracteriza como um campo tecnológico emergente que envolve a construção orientada por engenharia de entidades biológicas cada vez mais complexas para novas aplicações. Os principais aspectos de uma abordagem de engenharia são a orientação para propósitos específicos, a percepção profunda dos princípios científicos subjacentes, uma hierarquia de abstração incluindo interfaces adequadas entre e dentro dos níveis da hierarquia, padronização e separação entre projeto e fabricação. A biologia sintética investiga as possibilidades de implementar esses requisitos no processo de engenharia de sistemas biológicos (HEINEMANN; PANKE, 2006).

O advento da biologia de sistemas, o constante desenvolvimento de tecnologias fundamentais, como a síntese de novo de DNA (TIAN et al., 2004; HEINEMANN; PANKE, 2006), experimentos importantes, como o redesenho computacional de enzimas (DWYER, 2004; HEINEMANN; PANKE, 2006), a oportunidade de recombinar amplamente sistemas utilizando tecnologias como CRISPR-Cas9 (MAO, 2018), proteínas zinc-finger (DREIER et al., 2001; HEINEMANN; PANKE, 2006) e proteínas TALENs (WOOD et al., 2011) para reprogramar a especificidade do local de ligação ao DNA, e ainda a disponibilidade de sistemas regulatórios modelo bem definidos para o design de dispositivos moleculares inspirados em engenharia, fornecem uma base de conhecimento e tecnologia muito poderosa para a construção de novas entidades biológicas.

Aplicações encorajadoras vêm de áreas tão diversas quanto o desenho de redes de genes artificiais (SPRINZAK; ELOWITZ, 2005; HEINEMANN; PANKE, 2006), a refatoração de pequenos genomas (CHAN; KOSURI; ENDY, 2005; HEINEMANN; PANKE, 2006), a reprogramação de vias de sinalização (DUEBER, 2003; HEINEMANN; PANKE, 2006) ou engenharia metabólica (MARTIN et al., 2003; HEINEMANN; PANKE, 2006). Em conjunto, estas abordagens têm sido referidas como “biologia sintética”.

## **ENGENHARIA METABÓLICA**

A engenharia metabólica é um campo tecnológico em expansão que visa modificar o sistema metabólico endógeno de um organismo para aproveitá-lo em uma

tarefa biotecnologicamente útil como, por exemplo, a produção de um composto de interesse (ERB; JONES; BAR-EVEN, 2017).

Tem sido um dos objetivos finais da biologia chegar ao mesmo nível conceitual e sintético alcançado na química, desde o princípio das pesquisas em “engenharia metabólica” desenvolvidas no início dos anos 90. No entanto, as células ainda estão longe de serem pequenas fábricas para obtenção de produtos químicos (WOOLSTON; EDGAR; STEPHANOPOULOS, 2013), sendo que a engenharia metabólica continua sendo limitada na sua capacidade sintética, dependendo primariamente da transposição de vias metabólicas de um organismo para outro seguido por otimização desta via (ERB; JONES; BAR-EVEN, 2017).

Nestes esforços, diferentes enzimas existentes, de diferentes organismos ou de diferentes vias metabólicas conhecidas e que podem ser responsáveis por um passo específico de uma nova via metabólica sintética são integradas para realizar uma determinada tarefa metabólica com maior eficiência ou nova funcionalidade (ERB; JONES; BAR-EVEN, 2017).

Considerando as modificações genéticas baseadas em biologia sintética e engenharia metabólica, o aprofundamento do uso de técnicas e ferramentas de biologia molecular é necessário, tanto para modificação no genoma de um microorganismo ou alterações baseadas no uso de plasmídeos de expressão.

## **Ferramentas para biologia sintética e engenharia metabólica:**

### *Alterações no genoma*

A biologia molecular investiga técnicas de edição genética há décadas. Goldstein (2017) traz as primeiras definições de “engenharia genética” como o conjunto de técnicas de manipulação do DNA que surgem através da clonagem de um gene, colocando-o em um outro contexto a fim de ser propagado. Contudo, hoje o termo ganha novos horizontes, sendo utilizado para descrever toda e qualquer atividade que envolva a manipulação de DNA, introdução de alterações em células somáticas de animais e/ou plantas e alterações em células germinativas.

A engenharia genética ganhou volume no início da década de noventa. Foi quando, através da recombinação homóloga, células tronco embrionárias de ratos foram intencionalmente modificadas, sendo a primeira vez em que cientistas puderam selecionar e silenciar genes de interesse (THOMAS e CAPECCHI, 1987) (CAPECCHI, 1989). A partir disso, foi possível expandir o uso do ratos para gerar modelos de estudo de doenças humanas (expressando proteínas associadas à doenças através da substituição de genes normais por genes mutados). Embora o sucesso da metodologia, o desenvolvimento de abordagens alternativas, mais baratas e práticas, tornou-se necessário para seguir promovendo avanços nesse campo de pesquisa.

Cronologicamente, o primeiro mecanismo a surgir em seguida e ser amplamente utilizado foram as nucleases *Zinc-Finger* (*Zinc Finger Proteins*), seguido pelas

nucleases *TALEN* (*Transcription Activator-like Effector Nuclease*) e, mais recentemente, o complexo enzimático *CRISPR-Cas9* e suas variantes (dCas9, Cas13 e Cas12a) vem atraindo os olhares de pesquisadores mundo à fora (BATISTA e PACHECO, 2018).

As nucleases *Zinc-Finger* são abundantes domínios de ligação ao DNA em eucariotos e consistem de aproximadamente 30 aminoácidos, estabilizada por íons  $Zn^{2+}$ . Estas nucleases são capazes de reconhecer trípletos de DNA (trechos de no máximo três pares de base) e seu funcionamento depende da presença de um par de nucleases, um para a região *upstream* e um para a região *downstream* do sítio de clivagem, e de uma associação dos domínios à enzima de restrição *FokI*, que realiza a clivagem de fato (BATISTA e PACHECO, 2018) (LISTIK e CARMO, 2016).

A técnica tornou possível a edição gênica em mamíferos que não eram contemplados pelas técnicas previamente utilizadas. Como contrapontos da técnica estão descritos: (i) o alto custo; (ii) a complexidade da técnica e (iii) os altos índices de clivagem em regiões similares ao alvo (denominadas de *off-targets*) (FERNÁNDEZ et al., 2017).

Mesmo assim, ainda se há um espaço considerável para as *Zinc-Finger* até os dias de hoje, sendo muito utilizada para a detecção de DNA, conforme Batista e Pacheco (2018) discutem. Jen e Wang (2016) mencionam o uso das proteínas *Zinc-Finger* como potenciais marcadores de progressão de diferentes tipos de câncer em humanos.

Em 2011, pesquisadores identificaram em *Xanthomonas* um interessante mecanismo envolvendo domínios de ligação ao DNA (nesse caso, efetores pseudo-ativador de transcrição (*transcription activator-like effectors*)) associadas a uma *FokI* (CERMAK et al., 2011). Foi descoberto que as TALENs reconhecem sequências de DNA através de um mecanismo de pareamento de bases envolvendo resíduos de aminoácidos e pares de base específicos (e.g. asparagina-isoleucina reconhece Adenina) (LISTIK e CARMO, 2016).

As TALENs demonstraram-se vantajosas em relação às *Zinc-Finger* devido ao baixo índice de *off-targets*, característica dada pelas especificidades das cadeias de aminoácidos das TALENs, que conseguem se ligar a até 20 bases nitrogenadas. Além disso, enquanto as *Zinc-Fingers* possuem diversas restrições de montagem (JOUNG e SANDER, 2013), não se conhece complicações na capacidade de interação com sequências-alvo das TALENs nem com sua especificidade.

WareJoncas et al. (2018) afirmam que, até os dias atuais, as TALENs mantêm-se no topo das plataformas de DNA mais programáveis e com menos restrições ao seu funcionamento. Segundo os autores, o número de publicações que utilizam TALENs em suas metodologias ultrapassou substancialmente as publicações que utilizam *Zinc-Fingers* após a descoberta e aplicação dessa técnica, embora o alto custo monetário das TALENs impeça seu amplo uso em laboratórios de biologia molecular.

A descoberta de um complexo ribonucleoproteico – *CRISPR-Cas9* – tornou a edição gênica em uma tendência de pesquisa. *CRISPR* é a abreviação de Repetições

Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), um sistema natural encontrado nos mecanismos de imunidade em bactérias. As primeiras evidências do mecanismo vieram através do trabalho de Ishino et al. (1987), observando regiões espaçadoras e regiões de repetição no gene *lap* de *Escherichia coli*. Não muito tempo depois, a atividade da proteína *Cas9* (integrada no complexo *CRISPR*) foi observada envolvendo a degradação de plasmídios ou de fagos invasivos, identificando que as regiões espaçadoras são, na verdade, cópias de DNA viral.

A formação do complexo *CRISPR* começa com a transcrição de DNA viral (espaçadores) e com a transcrição das repetições que agem como domínios de regulação gênica. Em seguida, o RNA resultante (crRNA), juntamente com um RNA transativador (tracrRNA), liga-se à uma endonuclease *Cas9*, agindo como guia da enzima até a sequência alvo. Após o pareamento, a endonuclease induz uma quebra da dupla-fita de DNA para a clivagem da sequência alvo.

Os sistemas *CRISPR-Cas9* podem ser classificados em duas classes principais, de acordo com a performance das suas subunidades enzimáticas. A primeira classe consiste de complexos de múltiplas subunidades efectoras de RNA (tipos I, III e V), enquanto que a segunda classe consiste em efetores de RNA com uma única subunidade (tipos II e V) (KHADEMPAR et al., 2018; BARRANGOU et al., 2007).

A compreensão desse mecanismo trouxe vantagens na dinâmica da edição gênica por apresentar-se mais específica e dinâmica do que outros mecanismos prévios. A capacidade de realizar a fusão do crRNA e do tracrRNA em um único RNA guia (gRNA) simplificou o uso deste mecanismo, uma vez que, assim, a única necessidade para criar um complexo de interação com o DNA é criar um gRNA de interesse que seja capaz de atrelar-se à *Cas9*.

Com isso, o baixo custo da técnica aumentou a acessibilidade à tecnologia pelos laboratórios de biologia molecular ao redor do mundo. WareJoncas et al. (2018) evidencia que o *CRISPR-Cas9* possui limitações evidentes, como ainda apresentar clivagens em regiões *off-target* (similarmente às outras técnicas) e uma alta tolerância a interações não totalmente pareadas. Com isso, surgem tentativas de unificar diferentes técnicas, como *CRISPR-Cas9* + Sistemas *Zinc Finger*, juntando os monômeros FokI à proteínas *Cas9* inativadas, tornando o complexo mais específico e, assim, evitando *off-targets*.

Mais recentemente, variações da *CRISPR*, como a *CRISPR-Cas12a* (ou Cpf1) e *CRISPR-Cas13a* (gerado com gRNAs), oferecem alternativas às limitações do sistema dependente de *Cas9* através das particularidades exclusivas de cada variante. Por exemplo, o sistema *Cas12a* aparenta ser mais naturalmente específico do que o *Cas9* (KIM et al., 2016), enquanto que a *Cas13a* apresenta motivos proteicos similares às *TALE*, ligando-se cada uma a uma única base nitrogenada de RNA específica (dando ainda mais especificidade ao complexo).

Com a eficácia e barateamento das técnicas de edição gênica, principalmente

com o uso dos complexos *CRISPR*, crescem as pesquisas buscando mecanismos cada vez mais específicos de identificação e interação com uma sequência alvo.

As aplicações de diferentes técnicas de edição gênica (figura 1) podem ser vistas ao longo das décadas de seus usos, como: descobertas de mecanismos de desenvolvimento e funcionamento da vesícula biliar feitas com o uso de técnicas de entrega de genes aleatórios (*nontargeted gene delivery*) (Warejoncas et al., 2018); geração de modelos animais (como de camundongos (Marusugi et al., 2016), ratos (CHEN et al., 2013) e porcos (He et al., 2015) utilizando *zinc-finger*, *TALEN*, *CRISPR-Cas9* e inativação de genes/edição de genes-alvo (e.g. a recriação da mutação W no gene p.C147, associada a doença renal em ratos (JOHNSON et al., 2017).

Mais recentemente, um polêmico caso de pesquisa com embriões humanos virou o centro das atenções. He Jiankui, da Universidade do Sul de Ciência e Tecnologia da China, foi capaz de silenciar um gene envolvido na capacidade do vírus HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) de infectar células utilizando *CRISPR-Cas9*. O controverso trabalho levantou uma série de questões éticas, uma vez que há, ainda, a necessidade de aprimorar as técnicas de edição gênica, a fim de evitar efeitos indesejados de alterações no genoma que envolvem a clivagem parcial de sítios alvo, a clivagem *off-target* e os efeitos das deleções e modificações genéticas a nível transcricional, traducional, fisiológico e imunológico e a possibilidade da herdabilidade das alterações genéticas realizadas - algo que ainda é um desafio evidente para pesquisadores (REGALADO, 2018).

Os constantes avanços da pesquisa em edição gênica parecem, eventualmente, levar à edição de genes em humanos (com o objetivo de resolver problemas ligados à doenças atualmente sem cura ou tratamento), tornando evidente não apenas a necessidade de aprimorar as técnicas utilizadas, mas de discutir as questões éticas por trás dessa aplicação.

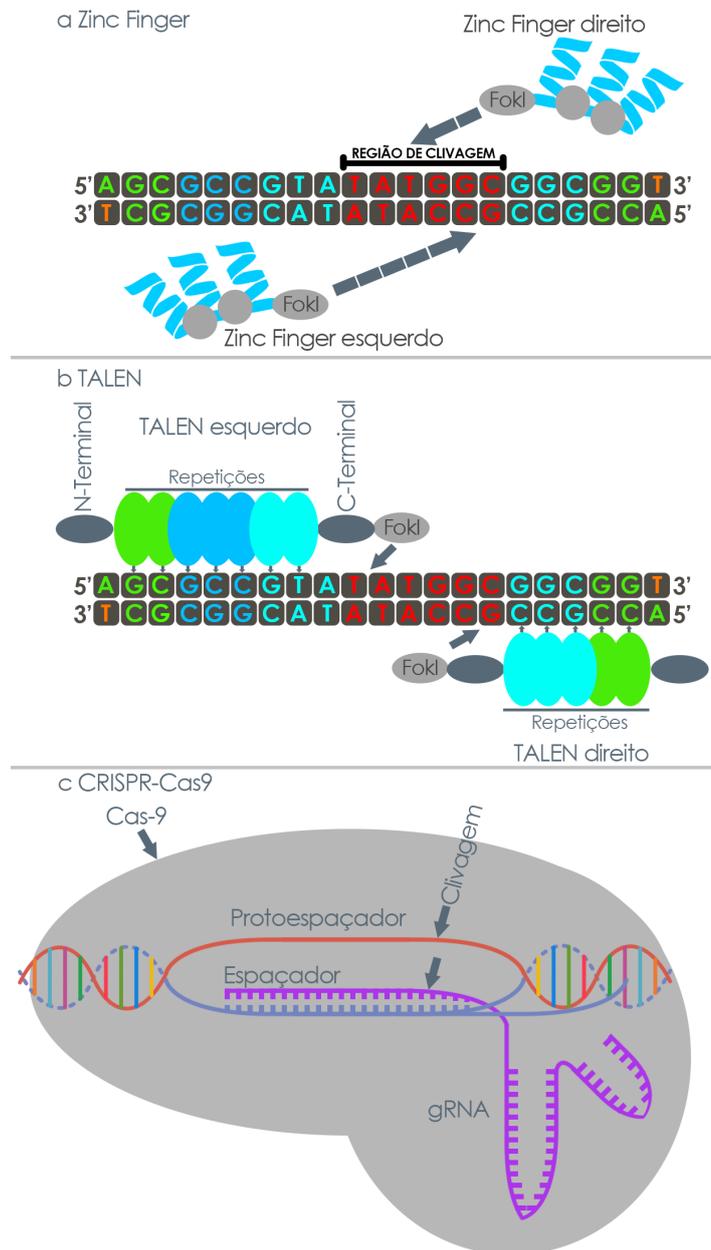


Figura 1: sistemas de modificação gênica utilizados para alterações a nível cromossomal ou outras aplicações de edição gênica *in vivo*. Adaptado de Warejoncas et al. (2018). Sistemas representados: (a) Zinc Finger; (b) TALENs e © CRISPR-Cas9.

## Alterações no nível de expressão de genes

O silenciamento gênico, fenômeno em que ocorre o bloqueio do processo de transcrição, ou degradação de RNA transcrito, também conhecido como RNA de interferência (RNAi), é um mecanismo celular que pode ocorrer durante a transcrição do RNAm (RNA mensageiro). As funções vitais de qualquer organismo dependem da expressão de seus genes, isto é, a partir do DNA os genes são primeiro transcritos para o RNA, e depois traduzidos em proteínas (LIPPMAN; MARTIENSSSEN, 2004).

Quando ocorre o silenciamento gênico, o RNAi (fragmento de aproximadamente vinte e um nucleotídeos complementares a sequência do RNA mensageiro) atua em conjunto com complexos enzimáticos e leva a degradação do RNA alvo ou o

impedimento físico do processo de tradução. Desse modo considera-se que o gene para dado transcrito foi “desligado” (LIPPMAN; MARTIENSSEN, 2004).

A ocorrência desse mecanismo foi identificada nos mais diversos organismos eucarióticos, como insetos, fungos, nematóides e plantas. A interferência por RNA ocorre naturalmente nesses organismos, funcionando como uma forma de regulação da produção de proteínas e como mecanismo de defesa contra vírus entre outras funções regulatórias (BRANTL, 2002).

Além da utilização de RNAi, outra alternativa que vem sendo estudada é o bloqueio físico de regiões promotoras utilizando CRISPR-dCAS (a enzima CAS possuindo uma mutação que inibe a sua atividade endonucleásica). Dessa forma, o processo de transcrição é interrompido antes da elongação e formação do RNAm. CRISPR-dCAS aparenta ser uma ferramenta mais versátil por poder ser aplicada tanto em eucariotos quanto em procariotos (XU; QI, 2019).

Sistemas de silenciamento gênico podem ser aplicados na terapia gênica, quando se busca evitar uma deleção completa de um gene específico ou apenas uma modulação na sua expressão. RNAi também pode ser utilizado no desenvolvimento de sistemas moleculares de combate a vírus de RNA e DNA em seres humanos, animais e plantas. A modulação específica na expressão de alguns genes também pode ser de interesse para preparar plantas de cultivo para situações de estresse biótico e abiótico (BRANTL, 2002; LIPPMAN; MARTIENSSEN, 2004; CULLEN, 2005; XU; QI, 2019).

### **Plasmídeos e sistemas para expressão extracromossomal**

Além dos métodos desenvolvidos para alteração genômica de eucariotos e procariotos, sistemas de superexpressão e sistemas de *switch* genéticos (que envolvem sistemas de sinalização e regulação de expressão de genes repórter ou ativação de vias metabólicas) e outros sistemas de deleção de genes foram desenvolvidos utilizando fragmentos circulares de DNA, conhecidos como plasmídeos ou vetores (PURNICK; WEISS, 2009).

A utilização de plasmídeos e vetores de expressão gênica foram as primeiras estratégias exploradas no desenvolvimento de organismos geneticamente modificados e no desenvolvimento de engenharia metabólica visando a superexpressão de proteínas de interesse (BERG; MERTZ, 2010).

Estes plasmídeos podem ser encontrados em bancos de dados como Adgene, Snapgene, iGEM repository, e adquiridos em diferentes empresas, sendo que no Brasil, pode-se adquirir sequências sintéticas inteiras clonadas em diferentes vetores de escolha pelo valor de R\$ 3,00 a R\$ 2,00 por par de base dependendo das especificações e do fornecedor.

Geralmente vetores e plasmídeos possuem três regiões distintas, essenciais para seu funcionamento, sendo elas: um sítio de replicação, para promover a multiplicação do plasmídeo no interior da célula chassis; um marcador expresso que atribui uma

característica específica a célula do organismo chassis, para posterior seleção de transformantes; e um sítio de múltipla clonagem (MCS) que permite a inserção de um fragmento de DNA específico. Como exemplo tem-se plasmídeos para clonagem e expressão de genes em procariotos que contém uma região *ori* de replicação de DNA plasmidial obtida de pBR322, uma região para expressão do gene para  $\beta$ -lactamase *ampR* que atribui resistência a antibióticos como ampicilina e penicilina para seleção de transformantes e um sítio de clonagem múltipla no interior de uma região codificadora, expressa sobre um promotor e operador *lac* Figura 2 (NOVAGEN, 2018).

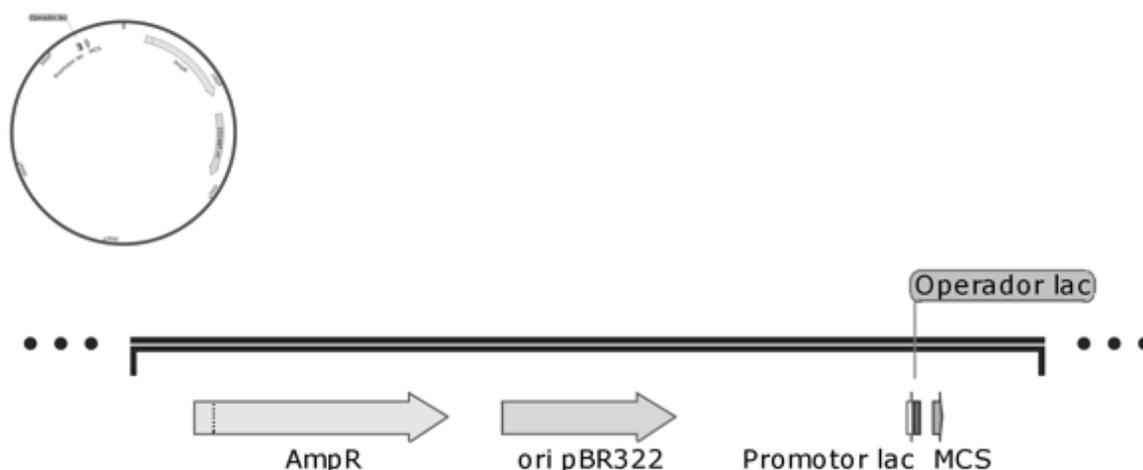


Figura 2: Exemplo de plasmídeo ou vetor para clonagem de seqüências de DNA específico. Imagem adaptada de vetor plasmidial pET-11a e desenvolvida utilizando software Snapgene (GSL Biotech LLC. 2017).

No sítio de clonagem múltipla (MCS) pode-se inserir diferentes combinações de partes e *biobricks* para desenvolvimento de novas funções metabólicas ou novos peptídeos e moléculas de DNA e RNA com funções específicas (NOVAGEN, 2018).

*Biobricks*, são partes partes, como promotores, reguladores, seqüências de codificação entre outras que são descritas e utilizadas conforme o sistema de linguagem aberta em biologia sintética (SBOL) para design de novas combinações e sistemas de expressão. *Biobricks* funcionam como um repositório de partes de seqüências de DNA que podem ser utilizadas em diferentes combinações para novas funções (Turing ATE my hamster LTD. 2018).

## Peptídeos e suas aplicações

Plasmídeos e construções de *biobricks* são aplicados no design de novas proteínas e enzimas que vão atribuir uma nova função ou alteração para obtenção do próprio peptídeo purificado ou compostos gerados a partir de vias metabólicas obtidas por engenharia metabólica, ou sistemas de sinalização para interpretação de substâncias e proteínas em um meio específico (PURNICK; WEISS, 2009).

Considerando a expressão heteróloga de proteínas e sua reformulação, diferentes domínios de enzimas e peptídeos inteiros podem ser ligados para formação de proteínas de fusão. Aplicações de uma enzima de fusão em diferentes conceitos é explorada na figura 3 (ELLEUCHE, 2014).

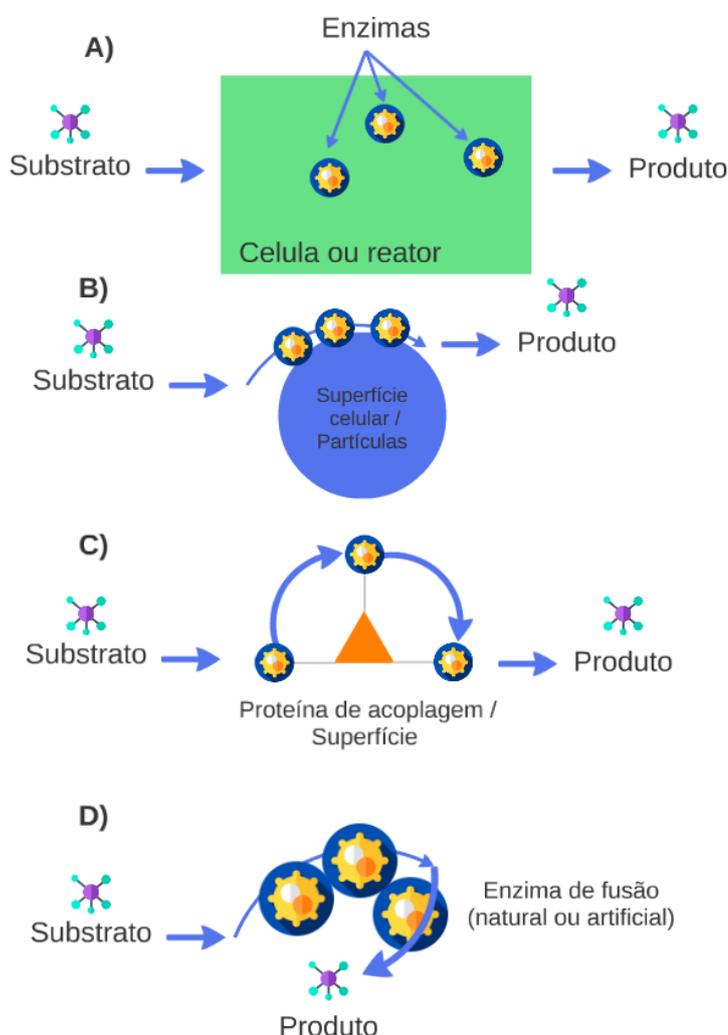


Figura. 3 Cascatas de reações acopladas em sistemas vivos como paradigmas para modelos artificiais. A) Ação combinada de três diferentes enzimas em um compartimento específico, como uma célula (natureza) ou em um reator de um único recipiente (sistema artificial) catalisa a conversão de um substrato para formação de um dado produto. B) As enzimas estão representadas na superfície celular, cell-surface display, (natureza) ou imobilizadas em partículas (sistema artificial). C) Enzimas são orientadas por uma proteína de suporte scaffold, como por exemplo em celulosomas (natureza) ou imobilizadas em uma superfície (sistema artificial). D) Uma enzima modular composta por três regiões ou domínios catalíticos (natureza) ou enzimas artificialmente fundidas (sistema artificial) catalisam três etapas de reação. Setas ilustram uma reação hipotética catalisada por três enzimas para converter um substrato em um produto. Adaptado de Elleuche (2014).

Além da fusão de enzimas e proteínas um processo de evolução e mutação direcionada de genes para proteínas já conhecidas pode levar a formação de vias metabólicas sintéticas mais rápidas e eficientes na utilização de substratos específicos, no desenvolvimento de novas proteínas repórter e cromoproteínas e aprimoramento de especificidade e capacidade de ligação de peptídeos, aptâmeros e fragmentos de

anticorpo voltados a identificação de epítomos específicos (ARNOLD, 2017).

Um exemplo complexo para aplicações destas técnicas são o desenvolvimento de novas vias metabólicas para obtenção do composto 2,3-butanodiol a partir do substrato glicerol em células *chassis* de *Klebsiella aerogenes* e *Escherichia coli*. Dentre as modificações aplicadas estão a superexpressão de enzimas para acelerar o consumo de glicerol e sua conversão em dihidroxiacetona para metabolismo em via metabólica de formação de piruvato, a superexpressão de genes para enzimas envolvidas na conversão de piruvato em 2,3-butanodiol, a deleção de genes para enzimas que levam ao desvio do piruvato para formação de outros subprodutos como acetato, etanol e lactato e a superexpressão de genes para auxiliar no reciclo de cofatores NAD e NADH envolvidos nos passos metabólicos de conversão de glicerol em 2,3-butanodiol e para manter o balanço redox interno das células *chassis* em homeostase. Também é explorado o uso de proteínas de fusão para realizar as funções descritas acima, um destes exemplos foi explorado pelo grupo de pesquisa do laboratório de biotecnologia e microbiologia aplicada da Universidade de Caxias do Sul, em que foi realizada a fusão das enzimas glicerol desidrogenase (para formação de dihidroxiacetona e NADH) e acetoína redutase (responsável pela formação de 2,3-butanodiol e NAD), esta estratégia visa trazer soluções para aumento no consumo de glicerol como substrato, aumento da produção de 2,3-butanodiol e um mutuo reciclo e reutilização de cofatores NAD e NADH, levando em consideração a aproximação física de ambas as enzimas (YANG; ZHANG, 2018).

## **Exemplos de aplicações recentes de engenharia metabólica e biologia**

### **sintética:**

Nos Estados Unidos, uma iniciativa chamada iGEM (genetically engineered machine) do MIT (Massachusetts Institute of Technology), realiza uma competição anual entre acadêmicos de nível de graduação para fomentar o desenvolvimento de novos designs e aplicações baseados em biologia sintética e a formação de empreendedores em biotecnologia (PURNICK; WEISS, 2009).

Entretanto, o uso de técnicas e aplicações em biologia sintética e engenharia metabólica não se restringem apenas a academia. Empresas e startups já vem desenvolvendo soluções e produtos baseados nestas técnicas, exemplos de empresas e startups que alcançaram investimento de 25 a 150 milhões de dólares em 2018 estão representadas na tabela 1 (SYNBIOBETA, 2018).

Startup/Empresa	Ramo de atuação ou Indústria	O que faz	País de fundação
Autolus Therapeutics	Indústria farmacêutica/ terapias para tratamento do câncer	Desenvolvimento de terapias com células T altamente direcionadas, controladas e altamente ativas. Engenharia de células T.	Reino Unido
Impossible foods	Indústria alimentícia	Desenvolve um hambúrguer de proteína vegetal contendo em seu ingrediente a levedura <i>Pichia pastoris</i> modificada expresando hemoglobina vegetal de raízes de plantas de soja.	Estados Unidos
Precision Biosciences	Indústria farmacêutica/ AgroIndústria/ Biotecnologia	Método próprio e sistemas de modificação genética <i>in vivo</i> . Terapia gênica e alteração de genes envolvidos com patologias e características específicas em plantas e animais.	Estados Unidos
Beam Therapeutics	Indústria farmacêutica	Utiliza a tecnologia CRISPR para editar genes e alterar uma única base nitrogenada. Modificação de SNP's (single nucleotide polymorphisms) utilizando CRISPR.	Estados Unidos
Synthorxs	Indústria farmacêutica	DNA sintético para tradução <i>in vitro</i> de peptídeos para uso como medicamentos e tratamentos.	Estados Unidos
Calyxt	AgroIndústria/ Indústria alimentícia	Edição genética utilizando TALEN para produção de plantas com traços que aumentem seu valor nutricional e quantidade de nutrientes. Foco na produção de alimentos para o consumidor final e não somente na produtividade.	Estados Unidos
Inovio Pharmaceutical	Indústria farmacêutica	Edição genética de células do sistema imune para combater células cancerosas e células infectadas com vírus. Produção de antígenos. <i>in vivo</i> Antigen-targeted immunotherapies.	Estados Unidos
Twist biosciences	Biotecnologia	Síntese de DNA. Produção de genes sintéticos.	Estados Unidos
Codexis	Biotecnologia	Evolução direcionada de proteínas e enzimas para aumento de especificidade e atividade catalítica entre outras atribuições. Protein engineering	Estados Unidos
Poseida Therapeutics	Indústria farmacêutica	Modificações genéticas em células CAR-T. Targeted immunotherapies.	Estados Unidos
Synlogics	Biotecnologia/Indústria farmacêutica	Desenvolvimento de microorganismos de microbioma, geneticamente modificados, utilizando engenharia metabólica para produção de compostos para tratamentos específicos a partir de um sistema gênico de circuitos para sinalizar ativação ou inativação destas vias metabólicas dependendo de sinais moleculares presentes no intestino.	Estados Unidos

Tabela 1: Empresas e startups que utilizam o conceito de biologia sintética e que alcançaram investimento de 25.000.000,00 US\$ a 150.000.000,00 US\$ em 2018 (SYNBIOBETA, 2018).

Os Estados Unidos lideram a inovação e formação de empresas em biologia sintética, sendo que se destacam sua aplicação na indústria alimentícia, na agroindústria e na medicina e indústria farmacêutica (SYNBIOBETA, 2018).

Outras aplicações que também vem sendo exploradas são o desenvolvimento de microrganismos para produção de combustíveis e outros compostos com aplicação na indústria química e de polímeros (SYNBIOBETA, 2018).

### **Acesso a capital para empreendedorismo em biologia sintética e biotecnologia**

No Brasil, a iniciativa privada também tem voltado sua atenção para o desenvolvimento de startups no setor de biotecnologia, sendo que aplicações em biologia sintética são de áreas de interesse de agências financiadoras como FINEP (Agência financiadora de inovação e pesquisa) e StartupBrasil do CNPq (Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico). Outros incentivos ao empreendedorismo em ciências da vida vêm de programas como BioStartupLab, que busca auxiliar pesquisadores e cientistas empreendedores ou levar soluções desenvolvidas na academia para o mercado. Outro espaço em expansão no incentivo a startups e empresas de biotecnologia são os pólos, parques e incubadoras tecnológicas nas universidades e instituições de pesquisa brasileiras.

Além dos incentivos nacionais, outros programas internacionais buscam startups de biologia sintética e biotecnologia para investimento em *seed capital* como os programas Rebelbio do Reino Unido e Indiebio dos Estados Unidos, ambos oferecem investimento inicial de 200.000,00 £ a 250.000,00 US\$ mais experiência, mentoria e aceleração de negócios em biotecnologia.

## **CONCLUSÕES**

O desenvolvimento da biologia sintética e suas aplicações vem crescendo tanto no âmbito acadêmico quanto no setor produtivo trazendo soluções para diversos problemas. A aplicação dos conceitos de engenharia na biotecnologia e a construção de sistemas baseados em *switch* gênicos podem simplificar e padronizar a construção destes sistemas complexos, tornando sua aplicação e entendimento mais acessível para acadêmicos, engenheiros e empreendedores em biotecnologia. Considerando os exemplos abordados neste trabalho, fica claro a liderança dos Estados Unidos no fomento a biologia sintética e a sua liderança em captação de capital para empresas deste ramo. No Brasil, apesar dos esforços recentes, o ecossistema de desenvolvimento em biologia sintética e engenharia metabólica permanece embrionário, apesar das possibilidades e vantagens nacionais envolvendo a bioprospecção de organismos de interesse, sendo o Brasil o país mais biodiverso do mundo. Os exemplos apresentados neste trabalho também podem servir de inspiração para acadêmicos e pesquisadores para o desenvolvimento de startups para atender o mercado nacional de biotecnologia.

## REFERÊNCIAS

- ARNOLD, Frances H.. Directed Evolution: Bringing New Chemistry to Life. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 57, n. 16, p.4143-4148, 28 nov. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201708408>.
- BALL, Philip. Synthetic biology—Engineering nature to make materials. **Mrs Bulletin**, v. 43, n. 7, p.477-484, jul. 2018. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1557/mrs.2018.165>.
- BARRANGOU, R. et al. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. **Science**, v. 315, n. 5819, p.1709-1712, 23 mar. 2007. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1138140>.
- BATISTA, Angelo C.; PACHECO, Luis G.c.. Detecting pathogens with Zinc-Finger, TALE and CRISPR-based programmable nucleic acid binding proteins. **Journal Of Microbiological Methods**, v. 152, p.98-104, set. 2018.
- BERG, P.; MERTZ, J. E.. Personal Reflections on the Origins and Emergence of Recombinant DNA Technology. **Genetics**, v. 184, n. 1, p.9-17, 1 jan. 2010. Genetics Society of America. <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.109.112144>.
- BRANTL, Sabine. Antisense-RNA regulation and RNA interference. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Gene Structure And Expression**, v. 1575, n. 1-3, p.15-25, maio 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0167-4781\(02\)00280-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0167-4781(02)00280-4).
- CAPECCHI, M.. Altering the genome by homologous recombination. **Science**, v. 244, n. 4910, p.1288-1292, jun. 1989.
- CERMAK, Tomas et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 12, p.82-93, 14 abr. 2011. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr218>.
- CULLEN, Bryan R. RNAi the natural way. **Nature Genetics**, v. 37, n. 11, p.1163-1165, nov. 2005. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1105-1163>.
- CHEN, Chun Cheng Andy et al. Heterozygous knockout of transforming growth factor- $\beta$ 1 protects Dahl S rats against high salt-induced renal injury. **Physiological Genomics**, v. 45, n. 3, p.110-118, fev. 2013. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.00119.2012>.
- DREIER, Birgit et al. Development of Zinc Finger Domains for Recognition of the 5'-ANN-3' Family of DNA Sequences and Their Use in the Construction of Artificial Transcription Factors. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 276, n. 31, p.29466-29478, 4 maio 2001. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m102604200>.
- DUEBER, J. E.. Reprogramming Control of an Allosteric Signaling Switch Through Modular Recombination. **Science**, v. 301, n. 5641, p.1904-1908, 26 set. 2003. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1085945>.
- DWYER, M. A.. Computational Design of a Biologically Active Enzyme. **Science**, v. 304, n. 5679, p.1967-1971, 25 jun. 2004. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1098432>.
- ELLEUCHE, Skander. Bringing functions together with fusion enzymes—from nature's inventions to biotechnological applications. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 99, n. 4, p.1545-1556, 24 dez. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-014-6315-1>.
- REGALADO, A. **EXCLUSIVE: CHINESE SCIENTISTS ARE CREATING CRISPR BABIES**. Massachusetts: MIT, 25 nov. 2018. Disponível em: <<https://www.technologyreview.com/s/612458/>>

exclusive-chinese-scientists-are-creating-crispr-babies/>. Acesso em: 10 dez. 2018.

ERB, Tobias J; JONES, Patrik R; BAR-EVEN, Arren. Synthetic metabolism: metabolic engineering meets enzyme design. **Current Opinion In Chemical Biology**, v. 37, p.56-62, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.12.023>.

FERNÁNDEZ, Almudena; JOSA, Santiago; MONTOLIU, Lluís. A history of genome editing in mammals. **Mammalian Genome**, v. 28, n. 7-8, p.237-246, 6 jun. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00335-017-9699-2>.

GSL BIOTECH LLC. **Snappgene plasmid viewer software**. 2017. Disponível em: <[www.snappgene.com](http://www.snappgene.com)>. Acesso em: 01 mar. 2017.

GOLDSTEIN, Elliott S.; KILPATRICK, Stephen T.; KREBS, Jocelyn E.. **Lewin's Genes XII**. 12. ed. Massachusetts: Jones & Bartlett Pub., 2017. 838 p.

HE, Jin et al. PKD1 Mono-Allelic Knockout Is Sufficient to Trigger Renal Cystogenesis in a Mini-Pig Model. **International Journal Of Biological Sciences**, v. 11, n. 4, p.361-369, 2015. Ivyspring International Publisher. <http://dx.doi.org/10.7150/ijbs.10858>.

HEINEMANN, M.; PANKE, S.. Synthetic biology--putting engineering into biology. **Bioinformatics**, v. 22, n. 22, p.2790-2799, 5 set. 2006. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btl469>.

ISHINO, Y. et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for the alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 12, p.5429-5433, 1987.

JEN, Jayu; WANG, Yi-ching. Zinc finger proteins in cancer progression. **Journal Of Biomedical Science**, v. 23, n. 1, p.1-9, 13 jul. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12929-016-0269-9>.

JOHNSON, Bryce G. et al. Uromodulin p.Cys147Trp mutation drives kidney disease by activating ER stress and apoptosis. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 127, n. 11, p.3954-3969, 9 out. 2017. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci93817>.

JOUNG, J. Keith; SANDER, Jeffrey D.. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 1, p.49-55, 21 nov. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3486>.

KHADEMPAR, Saedeh et al. CRISPR-Cas9 in genome editing: Its function and medical applications. **Journal Of Cellular Physiology**, p.1-11, 26 out. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.27476>.

KIM, Daesik et al. Erratum: Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p.888-888, ago. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0816-888a>.

LISTIK, E.; CARMO, A. C. V. As características dos mecanismos e sistemas de edição genômica. **Revista acadêmica Oswaldo Cruz**, v. 10, p.1-14, 2016.

LIPPMAN, Zachary; MARTIENSSSEN, Rob. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. **Nature**, v. 431, n. 7006, p.364-370, set. 2004. Springer Nature America, Inc. <http://dx.doi.org/10.1038/nature02875>.

MAO, Steve. Taking CRISPR technology further. **Science**, v. 360, n. 6387, p.393-393, 26 abr. 2018. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.360.6387.393-d>.

MARTIN, Vincent J J et al. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 7, p.796-802, 1 jun. 2003. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt833>.

MARUSUGI, Kiyoma et al. Functional validation of tensin2 SH2-PTB domain by CRISPR/Cas9-mediated genome editing. **Journal Of Veterinary Medical Science**, v. 78, n. 9, p.1413-1420, 2016. Japanese Society of Veterinary Science. <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.16-0205>.

NOVAGEN. **PET-11a-d Vectors**. Disponível em: <<https://biochem.web.utah.edu/hill/links/pET11a.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2018.

PURNICK, Priscilla E. M.; WEISS, Ron. The second wave of synthetic biology: from modules to systems. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 6, p.410-422, jun. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2698>.

SPRINZAK, David; ELOWITZ, Michael B.. Reconstruction of genetic circuits. **Nature**, v. 438, n. 7067, p.443-448, nov. 2005. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature04335>.

SYNBIOBETA. **Funding for synthetic biology companies**. Disponível em: <<https://synbiobeta.com/these-33-synthetic-biology-companies-just-raised-925-million/>>. Acesso em: 17 dez. 2018.

THOMAS, Kirk R.; CAPECCHI, Mario R.. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. **Cell**, v. 51, n. 3, p.503-512, nov. 1987.

TIAN, Jingdong et al. Accurate multiplex gene synthesis from programmable DNA microchips. **Nature**, v. 432, n. 7020, p.1050-1054, dez. 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature03151>.

Turing Ate My Hamster LTD. (SBOL) The Synthetic Biology Open Language. Disponível em: <<https://biobricks.org/>>. Acesso em: 12 dez. 2018.

XU, Xiaoshu; QI, Lei S.. A CRISPR-dCas Toolbox for Genetic Engineering and Synthetic Biology. **Journal Of Molecular Biology**, v. 431, n. 1, p.34-47, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2018.06.037>.

YANG, Zhiliang; ZHANG, Zisheng. Recent advances on production of 2, 3-butanediol using engineered microbes. **Biotechnology Advances**, v. 1, n. 1, p.1-39, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.03.019>.

WAREJONCAS, Zachary et al. Precision gene editing technology and applications in nephrology. **Nature Reviews Nephrology**, v. 14, n. 11, p.663-677, 8 ago. 2018. Springer Nature America, Inc. <http://dx.doi.org/10.1038/s41581-018-0047-x>.

WOOD, Andrew J. et al. Targeted Genome Editing Across Species Using ZFNs and TALENs. **Science**, v. 333, n. 6040, p.307-307, 23 jun. 2011. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1207773>.

WOOLSTON, Benjamin M.; EDGAR, Steven; STEPHANOPOULOS, Gregory. Metabolic Engineering: Past and Future. **Annual Review Of Chemical And Biomolecular Engineering**, v. 4, n. 1, p.259-288, 7 jun. 2013. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061312-103312>.

## A CONSTRUÇÃO DE MODELOS DIDÁTICOS DA ESTRUTURA DO DNA COM MATERIAIS ALTERNATIVOS: CRIANDO E APRENDENDO

### **Maria da Conceição dos Reis Leal**

Colégio Cruzeiro - Unidade Centro

Rio de Janeiro – Rido de Janeiro

### **João Gabriel Rangel Gonçalves**

Colégio Cruzeiro - Unidade Centro

Rio de Janeiro – Rido de Janeiro

**RESUMO:** O ensino de Biologia tem sido nas últimas décadas, objeto de estudo e preocupação para os pesquisadores em Educação, em função não só do vasto conteúdo programático, mas também da utilização de muitos termos técnicos e abstratos, que desmotivam os alunos. Estudos comprovam a construção de modelos didáticos são importantes ferramentas capazes de promover o aprendizado de forma lúdica, promovendo socialização e motivação pelo ato de aprender. Assim, o objetivo deste trabalho foi estimular os alunos da 2ª série do Ensino Médio do Colégio Cruzeiro – Unidade Centro, da rede privada de ensino do município do Rio de Janeiro, a confeccionarem modelos da molécula da dupla hélice do DNA, utilizando materiais alternativos, de modo a torná-los sujeitos ativos do processo de aprendizagem. Os resultados demonstraram que a atividade contribuiu não só para a assimilação do conteúdo e para o desenvolvimento de importantes habilidades para a construção do conhecimento, como a socialização, a

motivação, autonomia e a criatividade, como também para o reconhecimento do potencial dos materiais alternativos, que antes seriam descartados como lixo, na confecção de modelos pedagógicos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ensino Médio; Motivação; Criatividade; DNA; Modelo.

**ABSTRACT:** In recent decades, the teaching of biology has been the object of study and concern for researchers in education, due not only to the vast programmatic content but also to the use of many technical and abstract terms that discourage students. Studies prove the construction of didactic models are important tools capable of promoting learning in a playful way, promoting socialization and motivation through the act of learning. Thus, the objective of this work was to stimulate the students of the Secondary School of Cruzeiro College - Unit Center, of the private education network of the city of Rio de Janeiro, to make models of the molecule of the double helix of the DNA, using alternative materials, in order to make them active subjects of the learning process. The results showed that the activity contributed not only to the assimilation of content and to the development of important skills for the construction of knowledge, such as socialization, motivation, autonomy and creativity, but also for the recognition of the

potential of alternative materials, which would previously be discarded as garbage, in the making of pedagogical models.

**KEYWORDS:** High School; Motivation; Criativity; DNA; Model.

## 1 | INTRODUÇÃO

É difícil conceber um ensino de Biologia meramente teórico, assim como a visão tradicional do ensino, que coloca o aluno como agente passivo do processo ensino-aprendizagem (expectador) e pauta no professor o papel de detentor do conhecimento (transmissor). Esse modelo, que desconsidera o aluno como sujeito ativo, contribui para desestimular a curiosidade e o interesse pela compreensão de conceitos e/ou atividades que poderiam contribuir para o processo de construção de conhecimento no espaço escolar.

O ensino tradicional, centralizado na memorização e desvinculado da realidade do aluno, torna-se monótono e ineficiente necessitando ser superado por práticas pedagógicas inovadoras. Assim, diante de uma série de estratégias didáticas, amplamente divulgadas no âmbito escolar, os docentes devem se encorajar a experimentá-las a fim de encontrar aquelas que proporcionem uma aprendizagem mais atrativa, eficiente e significativa aos seus alunos. (Souto et al, 2016, p.1482)

Mas, apesar de sofrer constantes críticas, o modelo tradicional de ensino ainda faz parte do cotidiano escolar (RIBEIRO & SANTOS, 2001). Além disso, a linguagem presente nos livros didáticos é acadêmica, muitas vezes difícil e sem relação com a realidade dos jovens.

Diante deste quadro, o professor, comprometido com a sua prática pedagógica, procura criar um clima de expectativa e interesse nos alunos. Mas, apesar da disponibilidade de tantas ferramentas inovadoras no campo da educação, como por exemplo, os recursos da informática, o uso de multimídia, a interação com a internet, etc., o professor ainda se depara com muitas dificuldades em sala de aula, principalmente em relação à motivação dos alunos para a aprendizagem (FIALHO, 2008).

Neste contexto, a utilização de diferentes recursos didáticos corresponde a um importante fator dentre as diversas estratégias metodológicas desenvolvidas para facilitar e promover o processo da aprendizagem, atraindo o interesse dos alunos e possibilitando atender às diferenças individuais (KRASILCHICK, 2004).

O presente trabalho relata uma experiência com alunos da 2ª série do Ensino Médio, do Colégio Cruzeiro – Unidade Centro, na cidade do Rio de Janeiro, realizada no primeiro trimestre de 2017, que procurou facilitar o ensino da estrutura da dupla hélice da molécula do DNA, revisando os conteúdos que foram estudados ao longo desse período e integrando a informação à dimensão temporal, na busca da atenção dos alunos de forma espontânea, estabelecendo uma relação de relevância entre o tema estudado e o indivíduo. É constatada aqui a importância da confecção do modelo em foco no processo de ensino-aprendizagem, a partir de materiais alternativos

escolhidos pelos próprios alunos, constituindo um importante recurso didático motivador que auxilie o aluno, enquanto sujeito ativo desse processo, a pensar, possibilitando o desenvolvimento de sua imaginação e de sua capacidade de estabelecer analogias, contribuindo para a sua aprendizagem.

A proposta educacional utilizada procurou estimular os alunos, além de trabalhar com habilidades, geralmente não valorizadas nas aulas teóricas, como aquelas propostas por Gardner (1983)<sup>1</sup>. O autor introduziu uma “teoria de inteligências múltiplas”, em oposição aos testes de QI<sup>2</sup>, redimensionando a inteligência à luz das origens biológicas da habilidade para resolver problemas, na medida em que pontua que o cérebro é “o órgão do aprendizado”, com alta plasticidade e que sofre mudanças constantemente. Desta forma, o indivíduo está sempre predisposto a aprender. Para a Educação, a teoria proposta por Gardner implica na criação de um ambiente educacional mais amplo, que não esteja limitado unicamente aos sistemas simbólicos da lógica e da linguística, proporcionando aos indivíduos diferentes oportunidades de desenvolvimento em todas as áreas do conhecimento.

## 2 | O USO DE MODELOS DIDÁTICOS – A MOLÉCULA DO DNA

O conhecimento científico é amplamente divulgado atualmente através da mídia. Grande parte desse conhecimento permite que o ser humano seja capaz de alterar o patrimônio genético de todos os seres vivos, incluindo o seu. Esse fato provoca na sociedade tanto os sentimentos de euforia quanto de medo, visto que o ser humano tem agora não só a possibilidade de produzir seres perfeitos, possibilitar uma maior expectativa e qualidade de vida, como também de praticar uma seleção eugênica, com as implicações éticas decorrentes (SCHEID et al, 2003). É evidente que essas questões chegam ao espaço escolar, cabendo principalmente aos professores de Biologia, a tarefa de promover as reflexões e discussões acerca das mesmas. Ao mesmo tempo, os autores alertam que pesquisas demonstram que os alunos do ensino médio apresentam muitas dificuldades na compreensão dos conceitos básicos da Genética, como a relação gene/cromossomo e DNA/cromatina/cromossomo, por exemplo.

Diante desta realidade, a utilização de recursos didáticos diferenciados são instrumentos importantes, que podem auxiliar tanto na superação do paradigma tradicional do ensino, proporcionando a participação ativa dos alunos no processo de construção do conhecimento, quanto na compreensão dos conceitos trabalhados em sala de aula. O modelo didático em particular, simula, segundo Justina e Ferla

---

1. Em sua teoria, Gardner propõe sete potencialidades ou inteligências, afirmando que por razões genéticas e ambientais, os indivíduos são muito diferentes entre si quanto aos seus perfis intelectuais. As inteligências propostas pelo autor, que se somam às habilidades tradicionais são: corporo/sinestésica, visual/espacial, musical/rítmica, interpessoal e intrapessoal.

2. O teste de QI valoriza habilidades tradicionais escolares, como as habilidades lógico/matemática e a linguística/verbal.

(2005), uma estrutura/imagem de referência que possibilita a materialização de uma ideia ou um conceito, que colocado frente à realidade, possibilita a assimilação desses. Contribuindo para esta discussão, Krasilchik (2004), aponta que os modelos demonstrativos auxiliam o aluno a refletir e assimilar o conteúdo com mais facilidade, além de despertar um maior interesse do aluno para o processo ensino-aprendizagem.

Assim como a utilização de modelos tridimensionais foi de extrema importância para o processo de descoberta da estrutura do DNA, a apresentação da estrutura sob a forma de modelo nos diferentes níveis de ensino é um recurso que facilita a compreensão de vários fenômenos relacionados ao funcionamento dessa molécula.

Algumas características da molécula de DNA são facilmente representadas em figuras e outras exigem esquemas mais elaborados e maior esforço de abstração. Espera-se que a apresentação de modelos tridimensionais facilite não só a compreensão da estrutura como também a posterior interpretação de figuras, permitindo que o aluno reconheça com maior facilidade as situações relacionadas ao funcionamento celular que envolvem complementariedade e antiparalelismo das fitas do DNA, a existência dos sulcos e as possibilidades de mudanças nos parâmetros relacionados com a torção da molécula. (Sepel e Loreto, 2007, p.3)

O modelo da dupla hélice da molécula do DNA proposto em 1953 por James Watson e Francis Crick, contou com a contribuição de vários pesquisadores (WATSON & BERRY, 2005; FERREIRA & ANDRADE, 2015). O modelo em questão representa a molécula do DNA com conformação helicoidal, apresentando duas fitas de nucleotídeos antiparalelas e complementares a partir de ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas (GRIFFITHS et al., 2008).

Reconhecendo os benefícios didáticos da utilização de modelos da molécula do DNA, Sepel e Loreto (2007, p.3) destacam que há no mercado excelentes materiais, mas que geralmente são muito caros. Apesar de existirem propostas alternativas, empregando materiais acessíveis para a construção da molécula de DNA, “esses modelos envolvem tempo para a preparação e exigem do executor habilidades especiais, o que também limita a aplicação”.

Neste contexto, para Souto et al (2016, p.1483), “a confecção de modelos a partir de materiais mais simples, manipulados pelos próprios alunos, estimula o desenvolvimento de importantes habilidades para a construção do conhecimento”. Sendo uma atividade lúdica, o ato da construção dos modelos didáticos pelos alunos apresenta duas faces que contribuem para o sucesso da atividade educativa – o prazer e o esforço espontâneo. Tais características envolvem emocionalmente o indivíduo de forma intensa, tornando a atividade motivadora e criativa, proporcionando o fortalecimento das relações sociais, o desenvolvimento da capacidade de encontrar soluções para os problemas e a autonomia dos alunos.

### 3 | OBJETIVOS

#### Objetivo geral

Revisar os conteúdos sobre Ácidos Nucleicos – a molécula de DNA, trabalhados no primeiro trimestre, com o auxílio de modelos didáticos, estimulando o desenvolvimento de importantes habilidades para a construção do conhecimento como a socialização, motivação e a criatividade.

#### Objetivos específicos

Confeccionar modelos didáticos do modelo da dupla hélice da molécula de DNA, adaptados como instrumento de apoio, constituindo elementos úteis no reforço de conteúdos já estudados.

Incentivar a imaginação, a motivação, a criatividade, a construção de uma conscientização ecológica, além de promover a integração social entre os alunos.

### 4 | METODOLOGIA

Como prática facilitadora do aprendizado, ao final do primeiro trimestre do ano letivo de 2017, os alunos da 2ª série do Ensino Médio do Colégio Cruzeiro – Unidade Centro, da rede privada de ensino do município do Rio de Janeiro, foram incentivados a construir modelos didáticos da molécula do DNA a partir de uma determinada sequência de RNA mensageiro (transcrito) utilizando, na medida do possível, materiais reciclados e reutilizados. Esta atividade fez parte do quadro de avaliações do trimestre em foco.

No primeiro momento, as turmas foram divididas em grupos de 4 a 6 alunos, que receberam como suporte para a atividade, uma sequência de RNA mensageiro e um roteiro com as principais informações que deveriam ser abordadas junto ao modelo, que serviram de referenciais para a avaliação da atividade, tais como:

- Sequenciamento dos nucleotídeos de ambas as fitas do DNA;

- Identificação das bases nitrogenadas;

- Pareamento das bases nitrogenadas com indicação do número de ligações de hidrogênio entre elas;

- Identificação da fita ativa que originou a molécula de RNA mensageiro recebida;

- Sequenciamento dos aminoácidos de um oligopeptídeo a partir da leitura dos códons da molécula de RNA mensageiro recebido;

- Identificação e relação de todos os materiais utilizados com os componentes da molécula de DNA.

Foi solicitado também que os grupos procurassem utilizar materiais alternativos, como embalagens vazias, pedaços de garrafa pet, tampas de garrafas, barbantes, pedaços de fios, etc, com o intuito de estimular a criatividade e a construção de uma conscientização ecológica. A bibliografia sugerida foi o próprio livro didático adotado. O

prazo estipulado para a confecção e a entrega do modelo foi de aproximadamente um mês e a atividade foi desenvolvida de forma extraclasse, em períodos determinados pelos próprios grupos.

As etapas do trabalho foram acompanhadas pelos professores regentes, que promoveram a orientação das mesmas, sem tirar a autonomia dos alunos.

## 5 | ANÁLISE DOS RESULTADOS

Nas datas agendadas para a entrega dos modelos, os alunos apresentaram os mesmos, o que proporcionou, além da discussão sobre as principais características da molécula do DNA, a reflexão sobre alguns aspectos do seu funcionamento.

Os modelos confeccionados pelos alunos se mostraram extremamente didáticos, criativos, utilizando materiais diversificados (Figs.1, 2, 3 e 4), sendo a atividade ainda muito elogiada pelas turmas, que registraram ter assimilado melhor o conteúdo e de forma divertida e até mesmo, compreendido melhor os processos de fluxo da informação genética.

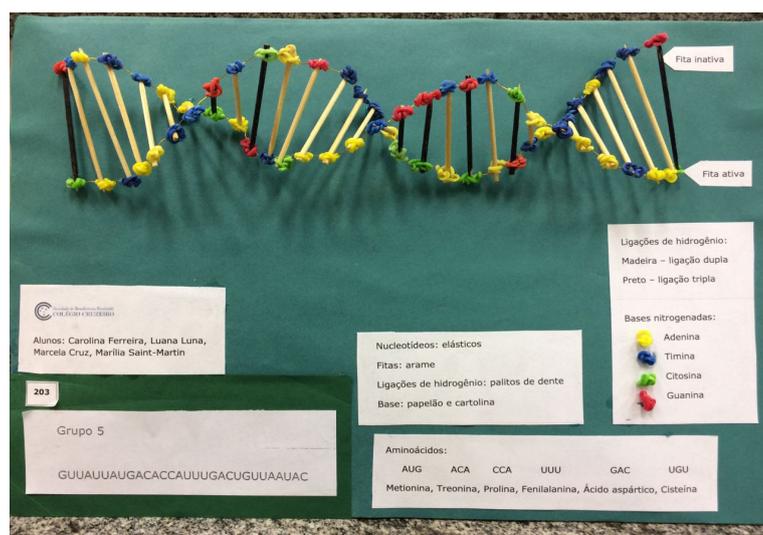


Figura 1: Modelo da molécula do DNA com legendas indicando os materiais utilizados e a sequência dos aminoácidos a partir da leitura da sequência de nucleotídeos de um RNA mensageiro.





aprendizagem para auxiliar os alunos a se apropriarem dos conhecimentos.

Nesse sentido, a utilização de modelos didáticos, que trabalhem a visão tridimensional é relevante, constituindo ferramentas instrucionais eficientes, auxiliando os alunos no entendimento dos fenômenos que ocorrem a nível microscópico, promovendo uma visão mais dinâmica desses fenômenos, facilitando o aprendizado e aumentando a capacidade de retenção do que foi ensinado, o que nem sempre é possível apenas com a utilização das ilustrações contidas nos livros didáticos.

Por meio da construção dos modelos didáticos, ainda são reveladas a autonomia, a criatividade e a originalidade. Além da questão visual, os modelos didáticos, segundo Aguiar (2003), permitem que os alunos manipulem os materiais, visualizando-os de vários ângulos, aprimorando dessa forma, a compreensão dos conteúdos trabalhados. Além disso, durante a construção dos modelos, os alunos ficam atentos com os detalhes intrínsecos desses e procuram a melhor forma de representá-los, o que contribui tanto para a revisão dos conteúdos, como também para o desenvolvimento das suas habilidades artísticas.

A experiência relatada neste artigo reflete a importância dos professores estarem num constante processo de repensar a elaboração de materiais didáticos utilizados na sua prática pedagógica, no sentido de promover a aprendizagem construtivista e significativa. Desta forma, estaremos contribuindo para o sucesso da aprendizagem, favorecendo a construção do conhecimento, permitindo o processo de socialização, despertando um maior interesse nos alunos, além do desenvolvimento da criatividade, ao mesmo tempo em que os conteúdos previstos para a série são trabalhados.

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, L.C.C. Modelos biológicos tridimensionais em porcelana fria – alternativa para a confecção de recursos didáticos de baixo custo. In: **Anais II Encontro Regional de Ensino de Biologia**, Niterói. pp. 318-321, 2003.

ALMEIDA, J.M.S. Construindo a célula animal em sala de aula. In: **Anais II Encontro Regional de Ensino de Biologia**, Niterói pp. 382-384, 2003.

FERREIRA, M.J.; ANDRADE, M. A. B. S. **Dupla-hélice: a construção de um conhecimento**. (livro eletrônico) 1ª edição. Londrina, 2015. Disponível em <<https://www.revistas.ufg.br/sv/article/view/38155>>. Acesso em: 14 jun. 2017.

FIALHO, N.N. **Os jogos pedagógicos como ferramentas de ensino**. VIII EDUCERE, Curitiba, 2008. Disponível em: <<http://bit.ly/2fnjlFH>>. Acesso em: 15 ago. 2016.

GARDNER, H. **Frames of Mind: The Theory of Multiple Intelligences**. Basis Books: New York, 1983.

GRIFFITHS, A. J. F., WESSLER, S.R., LEWONTIN, R.C., CARROLL, S.B. **Introdução à Genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

JUSTINA, L.A.D., FERLA, M.R.A. Utilização de Modelos Didáticos no ensino de Genética-Exemplo de Representação de Compactação do DNA Eucarioto. **Arquivos do MUDI**, v.10, n.2, p.35-40, 2005.

KRASILCHICK, M. **Prática de Ensino de Biologia**. 4.ed. São Paulo: EDUSP, 2004.

MOREIRA, M.A. **Aprendizagem significativa**. Ed. UNB, Brasília, 1999.

RIBEIRO, M.G.L.; SANTOS L.M.F. Atividades lúdicas no ensino de ecologia e educação ambiental: uma nova proposta de ensino. In: Encontro Regional de Ensino de Biologia. Niterói, 2001, **Anais...**, Niterói, 2001, p. 120-21.

ROTBAIN, Y., MARBACH-AD ,G., STAVY ,R. Effect of bead and illustrations models on high school students' achievement in molecular genetics. **Journal of Research in Science Teaching**, 43(5), pp. 500-529, 2006.

SCHEID, N.M.J., FERRARI, N., DELIZOICOV, D. A proposição do modelo de DNA: um exemplo de como a história da ciência pode contribuir para o ensino de Genética. In: Encontro Nacional de Pesquisa em Educação em Ciências, 4, **Atas...** Associação Brasileira de Pesquisadores em Educação em Ciências, Bauru. (CD-Rom), 2003.

SEPEL L.M.N., LORETO E.L.S. Estrutura do DNA em Origami – Possibilidades Didáticas, **Genética na Escola**, Departamento de Biologia; Rio Grande do Sul, UFSM, 2007.

SOUTO, Ú.R., SANTOS, J.R., BORGES, A.A. Proposta de Modelo da Dupla Hélice do DNA em um Contexto Histórico. **Revista do SBEnBio**, n. 9, 2016.

WATSON, J.D.; BERRY, A. **DNA: o segredo da vida**. São Paulo: Companhia das Letras, 2005.

## ALECRIM (*ROSMARINUS OFFICINALIS L.*): EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES E SUA IMPORTÂNCIA NO CONTROLE DA DOENÇA MANCHA FOLIAR EM PLANTAS DE CEVADA

### **Fernando Luquis**

Curso Farmácia, Diretoria da Saúde, UNINOVE,  
São Paulo

### **Brenda Mery Santos de Godoy**

Curso Biomedicina; Diretoria da Saúde,  
UNINOVE, São Paulo

### **Cristiane Santana Garcia**

Curso Biomedicina; Diretoria da Saúde,  
UNINOVE, São Paulo

### **Victor Alves Franklin**

Curso Biomedicina; Diretoria da Saúde,  
UNINOVE, São Paulo

### **Luciana Leite Oliveira**

Curso Biomedicina; Diretoria da Saúde,  
UNINOVE, São Paulo

### **Nilsa Sumie Yamashita Wadt**

UNIP, Saúde, São Paulo

### **Vinicius de Oliveira Cardoso**

Prof.UNINOVE, Depto. Saúde, São Paulo

### **Erna Elisabeth Bach**

Prof.UNINOVE, Depto. Saúde, São Paulo  
email:ernabach@gmail.com

**RESUMO:** Vários fitocompostos têm sido extraídos de plantas, podendo ser utilizados para vários fins, como, por exemplo, em medicamentos ou alimentos. O alecrim foi escolhido, pois possui várias utilidades como condimento, além de possuir propriedades cicatrizantes, antiespasmódicas, estimulantes

do sistema digestório, diuréticas, entre outras. O extrato foi avaliado frente a um modelo de planta de cevada por esta possuir uma fina camada de celulose que é sensível a compostos tóxicos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito dos compostos extraídos do alecrim, em plantas de cevada inoculadas com o patógeno *Bipolaris sorokiniana* verificando se o extrato possui a capacidade de dar resistência à planta. Foram avaliadas 3 concentrações do extrato sendo 0,606; 0,303 e 0,202mg de proteína em plantas de cevada Elis. Os resultados indicaram que plantas de cevada apresentaram de 65 a 80% de proteção contra a penetração do fungo. Em relação às análises bioquímicas foi possível observar que plantas submetidas a tratamento e depois ao patógeno, apresentaram maior concentração de proteínas e menor concentração de fenóis quando comparadas com plantas infectadas. O extrato de alecrim foi separado por cromatografia em gel e avaliado perante a folha de cevada destacada indicando que a fração 2 foi a melhor, contendo polifenóis sendo que o ácido clorogênico estava em maior concentração. Por conclusão, o extrato de alecrim pode ser usado como indutor de resistência em plantas de cevada contra mancha foliar.

**PALAVRAS-CHAVE:** Alecrim, antimicrobiano, cevada, resistência.

**ABSTRACT:** Many phytochemicals have been extracted from plants, being used for a variety of ends, such as, for example, in medicines or feed. The rosemary plant was chosen, due to its many uses as a condiment, besides possessing other described properties, being: wound healing, antispasmodic, gastrointestinal tract stimulant, diuretic, and others. The extract was evaluated against a barley plant model, due to this possessing a thin cellulose layer that is sensible to toxic compounds. The objective of the present work was to evaluate the effect of the compounds extracted from rosemary, in barley plants inoculated with the pathogen *Bipolaris sorokiniana*, evaluating whether the extract can lead to resistance against the pathogen or not. Three different concentrations of the extract were evaluated, those being: 0,606; 0,303; 0,202mg of protein in Elis barley plants. The results indicated that the barley plants presented fungus penetration protection ranging from 65 to 80%. Regarding the biochemical analysis, it was possible to observe that plants submitted to treatment and after inoculated by the pathogen presented an increased concentration of proteins and lower phenol concentration when compared with infected plants. The rosemary extract was separated by gel chromatography, and evaluated toward the barley leaf highlighted, indicating that fraction 2 presented the best results, containing polyphenols, with chlorogenic acid being in higher concentration. In conclusion, rosemary extract can be used as a resistance inductor in barley plants against leaf spot disease.

**KEYWORDS:** Rosemary; antimicrobial; barley; resistance

## 1 | INTRODUÇÃO

*Rosmarinus officinalis* L. da família LAMIACEAE (Labiatae) conhecida popularmente como alecrim, é uma espécie com interesse agrônômico, alimentício e fitoterápico. Existem outros nomes vulgares como alecrim-do-reino, alecrim-do-sul ou alecrim-verdadeiro (BEGUM et al., 2013; RAJA, 2012). O alecrim é rico em fitocompostos, além de ser utilizado em temperos na alimentação, pois ressalta o sabor de alguns pratos.

Além das suas propriedades nutricionais, aromatizantes e protetoras contra a degradação microbiana e oxidativa dos alimentos, possui efeitos benéficos para a saúde como: antidismenorreico, antiespasmódico, antinociceptivo, antiulcerogênico, diurético, devido aos seus diversos compostos fitoquímicos. (SASAKI et. al., 2013).

A atividade antioxidante de alecrim está relacionada a componentes como diterpenos fenólicos, carnosol e a sua capacidade antioxidante é devido principalmente aos compostos fenólicos que ocorre devido à capacidade de eliminar os radicais livres, doar hidrogênio, átomos e cátions de metal quelato (TERUEL et. al., 2015).

Seus principais compostos, os diterpenos - ácido carnósico (CA) e carnosol (CAR) e o ácido rosmarínico derivado do cafeoil, exerce vários efeitos benéficos na saúde, incluindo a capacidade antioxidante potente, hepaprotetor, antimicrobiano, anti-inflamatório, efeitos anticancerígenos e antidiabéticos (PÉREZ-SÁNCHEZ et. al., 2017).

Existem várias maneiras de proceder à extração dos metabólitos secundários com óleo, água ou álcool. O conhecimento das estruturas químicas dos produtos naturais, bem como de suas funções nas interações das plantas com os organismos vizinhos, possibilita uma melhor compreensão dos mecanismos bioquímicos dessas interações, tornando possível o desenvolvimento de novos agentes bioativos (BARNES et al., 2007).

No caso da mancha foliar causada pelo fungo *Bipolaris sorokiniana*, o controle é, normalmente, realizado por uso de fungicidas sendo que esta doença causa prejuízos aos produtores. Outro problema é o risco para o meio ambiente e para a saúde do homem. Visando eliminar estes inconvenientes, um dos métodos preconizados tem sido a utilização de indutores de resistência oriundos de produtos naturais.

A indução de resistência tem sido observada em várias plantas em resposta ao tratamento prévio do hospedeiro com agentes bióticos ou abióticos, denominados elicitores ou indutores de resistência (KUC, 1987; 2000; 2001; MANANDHAR et al., 1999). As plantas ativam um conjunto de respostas após o reconhecimento de um patógeno ou da aplicação exógena de indutor, assim, capacitando-as a responderem mais rapidamente à infecção promovendo uma resposta de resistência. A indução de resistência tem sido observada e sugerida como controle alternativo para diferentes doenças e interações como: trigo - *Bipolaris sorokiniana* e *Drechslera teres* (BACH, 1997; BACH et al, 2003); cevada - *Bipolaris sorokiniana* (CASTRO e BACH, 2004); café - *Hemileia vastatrix* (GUZZO et. al., 1993) e arroz - *Pyricularia oryzae* e *Bipolaris sorokiniana* (MANANDHAR et al, 1999).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi preparar o extrato do alecrim, avaliar os compostos fitoquímicos, verificar a presença de antioxidantes e o efeito como indutor de resistência em plantas de cevada inoculadas com o patógeno *Bipolaris sorokiniana* (mancha foliar).

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

As partes aéreas do Alecrim foram colhidas em Ibiúna, sendo transportadas para o laboratório da UNINOVE em geladeira de isopor. Para a obtenção do extrato de folhas de Alecrim, a fresco, 20g de folhas foram trituradas em 100mL de água destilada gelada. O extrato foi mantido em geladeira por uma hora e filtrado em gaze sendo armazenado em frasco de vidro e mantido a -4°C até a utilização (SILVA & BACH, 2005).

O extrato foi submetido à quantificação de proteínas através do método de Lowry, em equivalentes de SAB (Soro Albumina Bovina) (LOWRY, 1951) e, quantificação de fenóis baseado no método de SWAIN & HILLIS (1959), em equivalentes de ácido clorogênico.

Como antioxidante foi usado o método de ABTS (RUFINO et al, 2007) com a

reação envolvendo 7mM ABTS (5mL e 2,45mM (88mL) de persulfato de potássio, após incubação à temperatura ambiente e escuro por 16h. Após o período, foi diluído em 80% de etanol até dar uma absorbância de  $0,700 \pm 0.005$  a 734 nm. A medida de 2,7mL da solução de ABTS foi misturada devagar com 0,3mL das amostras. Após 30min a 30°C, foi realizada a leitura no espectrofotômetro na absorbância de 734nm. O padrão foi Trolox.

## 2.1 Preparação de plantas de cevada e tratamentos

As sementes de cevada de cultivo Elis foram fornecidas pela Fundação Agrária de Guarapuava, Paraná, sendo semeadas em vasos, mantidas em casa-de-vegetação à temperatura ambiente, até o estágio 5 da escala de Feekes-Large (LARGE, 1954). Na composição do substrato foi utilizada uma parte de solo vermelho, oriundo do Paraná e uma parte de terra vegetal adubada com NPK (na formulação Nitrogênio10, Fósforo-10, Potássio-10) e micronutrientes da marca Ouro Verde (de acordo com a especificação do produtor).

Grupos de dez plantas de cevada foram usados nos testes biológicos para cada tratamento, em 3 repetições. Em todos os tratamentos foram aspergidos cerca de 10 mL da suspensão de conídios ou, solução do extrato (indutor) ou ainda, água. O extrato aquoso de folhas de alecrim foi avaliado como indutor em 3 concentrações de proteína sendo 0,606; 0,303 e 0,202mg de proteína.

Os tratamentos foram: a) sadia (plantas aspergidas com água); b) tratadas com indutor (plantas aspergidas com extrato aquoso); c) inoculadas com o patógeno (plantas aspergidas com suspensão de conídios); d) tratadas com indutor e após 24 horas, inoculadas com suspensão de conídios; e) idem ao grupo d, inoculadas após 48 h; f) idem ao grupo d, inoculadas após 72 horas. As plantas dos grupos d, e, f, foram inicialmente aspergidas com indutor, após 24, 48 e, 72 h, sob condições de temperatura ambiente e fotoperíodo de 12 horas (luz fluorescente  $7,35 \text{ W m}^{-2}$ ). As folhas foram inoculadas, por aspersão, com as suspensões de conídios do isolado. Durante as primeiras 24h após a inoculação do patógeno, as plantas foram mantidas em câmara úmida (100% UR), temperatura ambiente e escuro. Em seguida, o material foi transferido para casa-de-vegetação e mantido sob condições de temperatura e luminosidade ambiente. A proteção das plantas foi avaliada 4 dias após a inoculação do patógeno de acordo com BACH (1997).

Das plantas induzidas à proteção, foi realizado um extrato envolvendo 5g de folha em 10mL de tampão fosfato de sódio pH=7 0,05mol/L. Os extratos foram também submetidos a testes de quantificação de proteínas e fenóis.

## 2.2 Purificação do extrato de alecrim e avaliação em folhas de cevada destacadas.

O extrato de alecrim foi submetido a cromatografia em gel filtração (Sephadex G-50), com tampão fosfato pH=7 0,05mol/L, coletando 2mL por tubo e preparando

pool de 4 frações. Todas as frações foram passadas no HPLC.

Folhas de cevada foram colocadas em 6 placas de Petri, com umidade mantida por algodão, e pinceladas as referidas frações sendo 1) fração 0: volume externo da coluna; 2) fração 1: volume interno da coluna correspondente a 6mL; 3) fração 2: volume interno da coluna correspondente a 10mL; 4) fração 3: volume interno da coluna correspondente a 14mL; 5) tampão fosfato como controle; 6) tampão fosfato para controle-fungo. Após 72h foi pincelado o conídio do fungo em todas as placas com exceção da placa 5, correspondente à planta sadia. Após 5 dias foram observadas o aparecimento de lesões e observada a proteção. A fração que indicou proteção foi avaliada por HPLC.

Compostos fenólicos foram separados no equipamento HPLC (Young Lin YL 9300) equipado com bomba quaternária, detector UV-vis e forno de coluna (YL9330). A coluna usada foi a Kinetex C18 (4.6mm×250mm i.d., 5µm) e o comprimento de onda foi 254nm. Eluição foi realizada a 1,0mL/min a 35°C. A fase A consiste em metanol e fase B foi 0,1% de ácido acético em água. O volume injetado foi de 20µL. Os compostos usados como padrão foram adquiridos da Sigma (ácidos cumárico, ferúlico, cafeico, rutina, quercetina, canferol) e dissolvidos em solvente grau HPLC (metanol). Para identificação foi usado o tempo de retenção e áreas dos picos correlacionados com concentração pelo software Clarity.

## 2.3 Estatística

Todos os experimentos foram realizados em duplicatas e a média analisada pelo método de Student's ou Origin (Anova).

## 3 | RESULTADOS

O extrato aquoso de folhas de alecrim apresentou 6,07mg de proteína e 2,52mg de fenol com atividade antioxidante de 950µmol TEAC\*/g. A partir do extrato bruto foram feitas as diluições.

Os resultados da indução de proteção podem ser observados na Tabela 1. O extrato na concentração de 0,202mg apresentou variação de 55 até 70% nos intervalos de tempo variando de 24 até 72h, mas, quando o extrato apresentou 0,606mg e 0,303mg a proteção foi semelhante, variando de 65 ou 68% até 80%, nos mesmos intervalos de tempo entre indutor e patógeno. Como as proteções foram semelhantes, as plantas oriundas do tratamento de 0,303mg de proteína foram submetidas à quantificação de proteína, fenol e análise por cromatografia de camada delgada. Estes resultados vieram ao encontro com os encontrados por GUZZO et al. (1993); BACH et al. (2003; 2012; 2014; 2015); CASTRO e BACH (2004).

Tratamentos	Extrato mg proteína		
	0,607	0,303	0,202
Alecrim água c	x	X	x
Alecrim água 24h	68* a,c	65 a,d	55 a,e
Alecrim água 48h	78 a,f	78 a,g	60 a,h
Alecrim água 72h	80 a,i	80 a,i	70 a,j
Infectada	0 b	0 b	0 b

Tabela 1: Porcentagem de proteção em folhas de cevada submetidas ao tratamento com indutor (extrato de alecrim em diferentes concentrações) nos diferentes intervalos de tempo entre indutor e patógeno.

\*Porcentagem de proteção. Primeira letra seguida por a, são significativamente diferentes do controle (plantas infectadas letra b) pelo teste T ( $P < 0,05$ ). Segunda letra diferente, indica diferença significativa nas linhas no mesmo tratamento. Os números representam média de um total de 50 folhas/tratamento.

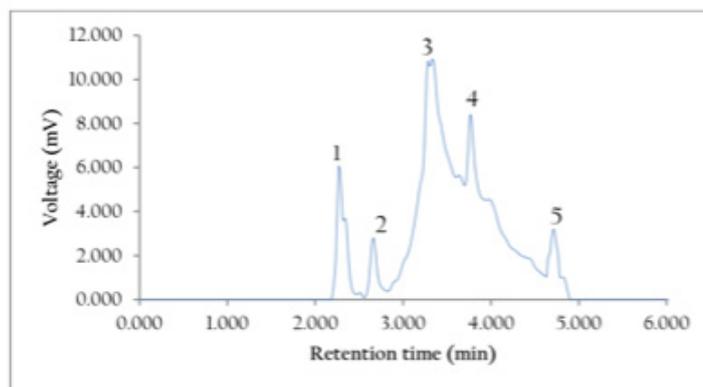
\*\*Quantidade de proteínas e fenóis seguidas por letra b, são significativamente diferentes do controle (plantas infectadas) pelo teste T ( $P < 0,05$ ).

Quando folhas de cevada, oriundas do tratamento com extrato de alecrim na concentração de 0,303mg de proteína, foi submetida a extração, foi possível determinar a concentração de proteína e fenol (Tabela 2). Observando primeiramente plantas saudas e infectadas, tem-se que plantas saudas apresentaram maior quantidade de proteína e, menor de fenol, sendo ao contrário em plantas infectadas quando estas apresentam baixa quantidade de proteína e maior quantidade de fenol, podendo ser devido pelo ataque do patógeno na planta com reação necrotrófica (Tabela 2). Já nas plantas tratadas, observou-se aumento de proteína conforme o aumento no intervalo de tempo. Os resultados estão de acordo com BACH et al. (2003, 2014, 2015) e CASTRO & BACH (2004).

Tratamentos	mg proteína	mg fenol
Alecrim água c	0,505	0,421
Alecrim água 24h	0,403	0,567
Alecrim água 48h	0,680	0,328
Alecrim água 72h	0,747	0,327
Sadia	0,773	0,490
Infectada	0,255	0,811

Tabela 2: Concentração de proteínas e fenóis presentes nos extratos de folhas de cevada submetidas ao tratamento com extrato de alecrim na concentração de 0.302mg de proteína.

As folhas de cevada destacadas e pré-tratadas com as frações coletadas da coluna de Sephadex G-50, e depois pinceladas com o fungo, apresentaram lesões nas placas 1,2,4, quando comparadas com sadia e folha infectada-controle. Assim, a única fração da placa 3, foi a que apresentou proteção. Esta fração foi avaliada no HPLC apresentando os seguintes compostos fenólicos: ácido clorogênico, ferúlico, quercetina e canferol (Tabela3).



Rt	Concentração	Composto
2,260	1,500 ug	ác. Clorogênico
2,650	0,570 ug	ác. Ferúlico
3,280	0,570 ug	Quercetina
3,760	8,00mV	Composto não identificado
4,710	0,310 ug	Canferol

Tabela 3: Resultado obtido no HPLC comparado com padrões fenólicos com respectivo tempo de retenção (Rt) e concentração.

Os resultados obtidos no trabalho apresentam concordância com ANDRADE et al (2018) e AL-SEREITI et al (1999) mostrando que polifenóis são compostos químicos antioxidantes e classificados como ácidos fenólicos, flavonóides e não flavonóides. As propriedades antioxidantes podem ser responsáveis pela defesa de plantas contra patógenos e predadores, podendo controlar, também, infecções em humanos. Existem vários polifenóis no alecrim, sendo o ácido clorogênico o mais abundante, e um dos responsáveis pela indução de resistência na folha de cevada.

#### 4 | CONCLUSÃO

Concluiu-se que o extrato de alecrim promoveu a indução de resistência em plantas de cevada no controle do fungo causador da mancha foliar, tendo o ácido clorogênico como um dos compostos responsáveis pela indução de resistência em plantas.

#### AGRADECIMENTO

Ao CNPq pelo auxílio na aquisição do HPLC e reagentes (Processo número: 474681/2013).

## REFERÊNCIAS

- AL-SEREITI MR, ABU-AMER KM, SEN P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. **Indian J.Exp. Biol.** 37(2): 124–130, 1999.
- ANDRADE, J.M.; FAUSTINO, C.; GARCIA, C.; LADEIRAS, D.; REIS, C.P.; RIJO, P. *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. **Future Sci. OA** 4(4): FSO283, 2018.
- BACH, E.E. Distinção morfológica e isoenzimática de *Bipolaris* spp. e *Drechslera tritici-repentis* do trigo; aspectos bioquímicos nas interações e indução de resistência, **Tese de doutorado, USP, Esalq**, SP, 150pp, 1997.
- BACH, E.E.; BARROS, B.C.; KIMATI, H. Induced Resistance against *Bipolaris bicolor*, *Bipolaris sorokiniana* and *Drechslera tritici-repentis* in Wheat Leaves by Xanthan Gum and Heat-Inactivated Conidial Suspension. **Journal of Phytopathology** 151: 411–418, 2003.
- BACH, E.E.; MARCONDES, M.C.S.; PATRICIO, G.F.; ESQUERDO, K.F.; CARDOSO, V.; WADT, N.S.Y. Aqueous extract of leaves from *Bauhinia variegata* used in barley plants to protect against *Bipolaris sorokiniana*. **Agricultural Research and Reviews** 1(3): 71 – 79, 2012.
- BACH, E.E.; ESQUERDO, K.F.; OLIVEIRA, M.B.F.; REIS, F.A.; CARDOSO, V.O.; WADT, N.S.Y. Control of spot blotch in barley plants with fungicide and *Bauhinia variegata* Linn. leaf extract. **Emir. J. Food Agric.** 26: 630-638, 2014.
- BACH, E.E.; SILVA, K.M.; NASCIMENTO, J.R.N.; MOTOSHIMA, M.Y.S.; JUNIOR, J.A.S.; HI, E.M.B.; WADT, N.S.Y. Uso do polissacarídeo extraído do fungo *Tremella fuciformis* Berk como controle da mancha foliar em plantas de cevada, **XXX Anais da Embrapa**, t. 24, 2015.
- BARNES, J.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. **Herbal Medicines** (3rd ed., p. 710), 2007. London: Pharmaceutical Press.
- BEGUM, A.; SANDHYA, S.; SHAFFATH ALI, S.; VINOD, K. R.; REDDY, S.; BANJI, D. An indepth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, 12: 61–73, 2013.
- CASTRO, O.; BACH, E.E. Increased production of b-1,3 glucanase and proteins in *Bipolaris sorokiniana* pathosystems treated using commercial xanthan gum. **Plant Physiology and Biochemistry**, 42: 165-169, 2004.
- GUZZO, S.D.; BACH, E.E.; MARTINS, E.M.F.; MORAES, W.B.C.. Crude exopolysaccharides (EPS) from *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, *X. campestris* pv. *campestris* and commercial xanthan gum as inducers of protection in coffee plants against *Hemileia vastatrix*. **Journal of Phytopathology**, 139: 119-128, 1993.
- KUC, J. Plant immunization and its applicability for disease control. In: Chet K.(ed). **Innovative approaches to plant disease control**, New York, John Wiley & Sonns, 255-274pp, 1987.
- KUC, J. Development and future direction of induced systemic resistance in plants. **Crop Protection**, 19: 859-861, 2000.
- KUC, J. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. **European J Plant Pathol**, 107: 7-12, 2001.
- LARGE, E.C. Growth stages in cereal: Illustration of the Feekes scale. **Plant Pathology**, New York. 3: 129, 1954.

- LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal Biological Chemistry**, Baltimore, 193: 265-275, 1951.
- MANANDHAR, H.K.; MATHUR, S.B.; SMEDEGAARD-PETERSEN, V.; THORDAL-CHRISTENSEN, H. Accumulation of transcripts for pathogenesis-related proteins and peroxidase in rice plants triggered by *Pyricularia oryzae*, *Bipolaris sorokiniana* and UV light. **Physiol Mol Plant Pathol.**, 55: 289–295, 1999.
- PÉREZ-SÁNCHEZ, A.; BORRÁS-LINARES, I.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, I.; IBÁÑEZ, E.; SEGURA-CARRETERO, A.; BERMEJO, M.; MICOL, V. Evaluation of the intestinal permeability of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract polyphenols and terpenoids in Caco-2 cell monolayers. **PloS one**, 12 (2): e0172063, 2017.
- RAJA, R. R. Medicinally Potential Plants of Labiatae (Lamiaceae) Family: An Overview. **Research Journal of Medicinal Plant**, 6: 203–213, 2012.
- RUFINO MSM., ALVES RE., BRITO ES., MORAIS SM., SAMPAIO CG., PÉREZ-JIMÉNEZ J., SAURA-CALIXTO FD. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS +. Comunicado técnico 128 Embrapa. **Embrapa Agroindústria Tropical**, 128: 1-6, 2007.
- SASAKI, K.; OTHMAN, M. B.; DEMURA, M.; WATANABE, M.; ISODA, H. Rosmarinus officinalis polyphenols produce anti-depressant like effect through monoaminergic and cholinergic functions modulation. **Behavioural brain research**, 238: 86-94, 2013.
- SILVA, A. A. O.; BACH, E. E. Extrato de gengibre como indutor de resistência sistêmica em plantas de cevada (Embrapa 128) contra *Bipolaris sorokiniana*. In: 25 Reunião Anual de Pesquisa de Cevada, Guarapuava, PR. **EMBRAPA** 25:411-418, 2005.
- SWAIN, R.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 10:63-68, 1959.
- TERUEL, M. R.; GARRIDO, M.D.; ESPINOSA, M.C.; LINARES, M.B. Effect of different format-solvent rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis*) on frozen chicken nuggets quality. **Food chemistry**, 172: 40-46, 2015.

## ALELOPATIA DE EXTRATOS AQUOSOS DE *Eragrostis lugens* Nees. NA GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE *Oryza sativa* L

### **Daniela Sponchiado**

Universidade Federal de Santa Maria – UFSM  
- Mestranda no Curso de Pós-Graduação em  
Agrobiologia  
Santa Maria/ RS.

### **Jéssica Cezar Cassol**

Universidade Federal de Santa Maria – UFSM  
- Mestranda no Curso de Pós-Graduação em  
Agrobiologia  
Santa Maria/ RS.

### **Douglas de Lima Righi**

Universidade Federal de Santa Maria – UFSM –  
Aluno do Curso de Graduação em Agronomia/  
Bolsista de Iniciação Científica.  
Santa Maria/ RS

### **Lucas Menezes Jorge**

Universidade Federal de Santa Maria – UFSM –  
Aluno do Curso de Graduação em Agronomia/  
Bolsista de Iniciação Científica.  
Santa Maria/ RS

### **Eduarda Mena Barreto**

Universidade Federal de Santa Maria – UFSM –  
Aluna do Curso de Graduação em Agronomia/  
Bolsista de Iniciação Científica.  
Santa Maria/ RS

### **Juçara Terezinha Paranhos**

Universidade Federal de Santa Maria – UFSM  
– Professora Doutora do Centro de Ciências  
Naturais e Exatas/ Orientadora no Programa de  
Pós-Graduação em Agrobiologia.  
Santa Maria/ RS

**RESUMO:** Uma das estratégias utilizadas pelas plantas invasoras para competir e dominar comunidades vegetais é a liberação de aleloquímicos - fenômeno este chamado de alelopatia. A cultura do arroz (*Oryza sativa*) no Rio Grande do Sul sofre a interferência de diversos fatores durante o ciclo biológico, com impacto na produtividade. Um desses fatores é a competição com plantas invasoras ou daninhas, entre elas a espécie *Eragrostis lugens* (eragrostis, pasto-ilusão ou pastomoscito). Extratos aquosos de folhas desta espécie foram preparados nas concentrações 4,0, 8,0 e 16,0 % (p/v) com o objetivo de avaliar o potencial alelopático na germinação das sementes e crescimento inicial das plântulas de arroz. Os bioensaios foram montados em placas de petri e mantidos em câmara de crescimento. O número de sementes germinadas foi aferido a cada 24 h por sete dias, sendo então obtidas a percentagem de germinação (%G) e o índice de velocidade de germinação (IVG). O comprimento da radícula e da parte aérea foram mensurados aos sete dias de experimento. Os extratos de folhas de *Eragrostis lugens* apresentam efeito alelopático reduzindo e/ou inibindo a percentagem e o índice de velocidade de germinação das sementes de arroz, bem como o desenvolvimento inicial das plântulas, em uma relação concentração dependente, sendo a radícula mais sensível à ação dos

aleloquímicos quando comparada à parte aérea.

**PALAVRAS-CHAVE:** alelopatia; arroz; pasto mosquito; planta daninha; germinação; crescimento inicial.

**ABSTRACT:** One of the strategies used by invasive plants to compete and dominate plant communities is the release of allelochemicals - a phenomenon called allelopathy. The rice crop (*Oryza sativa*) in Rio Grande do Sul suffers the interference of several factors during the biological cycle, with an impact on productivity. One of these factors is competition with invasive or weedy plants, among them the species *Eragrostis lugens* (eragrostis, pasto-delusion or grass-mosquito). Aqueous extracts of leaves of this species were prepared at concentrations of 4.0, 8.0 and 16.0% (w / v) with the objective of evaluating the allelopathic potential in seed germination and initial growth of rice seedlings. The bioassays were mounted on petri dishes and kept in a growth chamber. The number of germinated seeds was measured every 24 hours for seven days, and the germination percentage (% G) and the germination rate index (IVG) were obtained. The radicle and shoot length were measured at seven days of experiment. Leaf extracts of *Eragrostis lugens* present an allelopathic effect reducing and / or inhibiting the percentage and rate of germination speed of rice seeds, as well as the initial development of the seedlings, in a concentration-dependent ratio, the radicle being more sensitive to the action of allelochemicals when compared to aerial part.

**KEYWORDS:** allelopathy; rice; mosquito grass; weed; germination; growth.

## 1 | INTRODUÇÃO

Uma das estratégias utilizadas pelas plantas invasoras para competir e dominar comunidades vegetais é a liberação de aleloquímicos - fenômeno este chamado de alelopatia (LARCHER, 2000). A alelopatia pode ser definida como um processo através do qual, produtos provenientes do metabolismo secundário vegetal são liberados no ambiente, podendo impedir ou promover a germinação e/ou o crescimento de plantas que se encontrem relativamente próximas a elas (SOARES, 2000; FERNANDEZ et al., 2006).

A cultura do arroz, assim como outras culturas comerciais, sofre a interferência de diversos fatores durante o ciclo biológico, com impacto na produtividade (FLECK, 2000). Um desses fatores é a competição com plantas daninhas poáceas (gramíneas), principalmente por luz e nutrientes (DORNELLES, 2009).

Nos últimos anos, espécies gramíneas (Família Poaceae) perenes e anuais, que ocorrem comumente em áreas no entorno das lavouras, têm sido encontradas nos quadros onde se cultiva o arroz no Rio Grande do Sul. Entre elas, destacam-se *Panicum dichotomiflorum*, e espécies do gênero *Eragrostis* (CANTO-DOROW, 2011). Uma das espécies, dentro deste gênero, que é invasiva das lavouras arrozeiras é *Eragrostis lugens*, conhecida popularmente como eragrostis, pasto-ilusão ou pasto-

mosquito.

*E. lugens* é uma planta perene que se desenvolve tanto em áreas de coxilha, quanto em áreas de várzea, e reproduz-se por sementes. Pertence à família Poaceae, sendo muito próxima morfológicamente do capim-annoni (*E. plana*), que desde a década de 90 é considerada como a invasora mais agressiva e de mais difícil controle na cultura do arroz no Rio Grande do Sul (COSTA et al., 2013).

Neste sentido, o presente trabalho tem por objetivo realizar a avaliação da alelopatia de extratos aquosos de *Eragrostis lugens* na germinação e crescimento inicial de *Oryza sativa*, visando entender os mecanismos e as mudanças fisiológicas causadas pelos mesmos nas plantas afetadas.

## 2 | METODOLOGIA

### 2.1 Material vegetal

Foram utilizadas folhas de *Eragrostis lugens*, coletadas em lavouras de arroz irrigado na região de Santa Maria -RS, lavadas e secas em estufa a 40 °C por sete dias e posteriormente trituradas em moinho para a preparação dos extratos vegetais. Os diásporos (fruto cariopse concrecido com a semente e protegido pelas brácteas lemas) foram usados para os testes de germinação das sementes e crescimento inicial das plântulas de arroz (*Oryza sativa*).

### 2.2 Obtenção dos extratos

Os extratos aquosos (água destilada) foram preparados nas concentrações 4,0, 8,0 e 16,0 % (p/v) de folhas de *E. lugens* (secas e previamente trituradas). Posteriormente foram deixados por 24 h no escuro e em temperatura controlada (25 °C). Após, foram filtrados em algodão, sendo o pH ajustado para  $\pm 5,8$  e o potencial osmótico mensurado através do método de Chardakov (1953). O tratamento controle constou de água destilada, com pH ajustado para mesmo valor.

### 2.3 Germinação das sementes e crescimento inicial

Em câmara de fluxo laminar, os diásporos de arroz foram desinfestados em etanol 70% por um minuto, seguido de solução de hipoclorito de sódio 0,2% por 15 minutos e três lavagens em água destilada. Após, foram inoculados em placas de petri (150 mm de diâmetro), contendo duas camadas de papel germitest e pré-embebidas com 20 mL das diferentes concentrações dos extratos e vedadas com plástico parafilm. As culturas foram mantidas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25°C.

As três concentrações de extrato de *E. lugens* mais o controle constituíram os tratamentos, com cinco repetições, e cada repetição constou de duas placas contendo

20 diásporos cada.

O número de sementes germinadas foi aferido a cada 24 h durante o período de sete dias. Foram considerados germinados os inóculos que apresentaram no mínimo 1,0 mm de radícula, sendo então obtida a percentagem de germinação (%G), conforme Labouriau & Valadares (1976) e o índice de velocidade de germinação (IVG), conforme Maguire (1962).

Os dados do crescimento inicial das plântulas foram coletados ao final dos sete dias de experimento, sendo que o comprimento, em centímetros da radícula e da parte aérea foi mensurado com o auxílio de uma régua.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e a comparação entre as médias foi efetuada através do teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), utilizando-se o programa estatístico SISVAR.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização físico-química dos extratos aquosos revelou variação de potencial osmótico na faixa entre 0.03 e 0.01 MPa. De acordo com Ferreira e Aquila (2000), nos estudos de alelopatia, o potencial osmótico é um aspecto pouco considerado e que pode mascarar o fenômeno alelopático. Os efeitos do potencial osmótico podem ser notados no comportamento germinativo pelo atraso na velocidade de germinação, mas os efeitos osmóticos também são observados sobre o crescimento da planta.

Os valores de potencial osmótico encontrados nos extratos utilizados no presente trabalho consideram-se adequados para a germinação e crescimento inicial das plântulas. Assim, discrimina-se a influência do pH (ajustado a  $\pm 5,8$ ) e do potencial osmótico nos resultados alcançados. A concentração osmótica dos extratos é fundamental, pois pode haver neles substâncias como açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos que influem no pH e são osmoticamente ativos (FERREIRA & AQUILA, 2000).

Comparando as diferentes concentrações dos extratos, registrou-se interferência na germinação de sementes para os parâmetros percentagem de germinação e índice de velocidade de germinação. O processo germinativo das sementes de arroz foi influenciado negativamente pelos extratos de *E. lugens* quando comparados ao tratamento controle.

O percentual de germinação das sementes de arroz foi afetado em uma relação concentração dependente, ou seja, quanto maior a concentração do extrato, maior o efeito observado. Este fato é bem evidente na concentração mais elevada (16,0 %), em que foram registrados os menores valores de germinação (FIGURA 1). Fiorenza et al. (2016), testando o potencial alelopático de uma espécie do mesmo gênero, *Eragrostis plana* observaram que os extratos aquosos desta planta apresentaram efeito alelopático sobre a germinação de espécies forrageiras, sendo este efeito maior evidenciado nas concentrações mais elevadas.

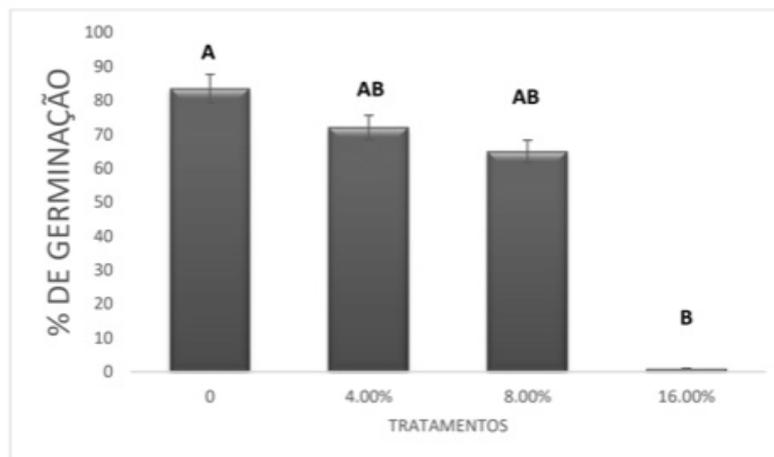


FIGURA 1- Percentagem de germinação de sementes de arroz sob efeito de extratos aquosos de *Eragrostis lugens*. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Os valores do IVG apresentaram uma relação de proporcionalidade com os da porcentagem de germinação, havendo alteração nos mesmos sob o efeito dos extratos aquosos de *E. lugens*. Observam-se diferenças significativas entre todos os tratamentos, tanto quando comparados ao controle, quanto entre si. A redução do Índice de velocidade da germinação é proporcional ao aumento da concentração do extrato (FIGURA 2). Tais resultados corroboram com os observados por Ferreira, et al. (2008), nos quais o índice de velocidade de germinação de gramíneas tropicais e alface foi alterado pelas diferentes concentrações de extratos aquosos de *E. plana*. De acordo com Ferreira & Borghetti (2004), quanto maior o IVG, maior é o vigor das sementes. No presente trabalho, os extratos atuaram diminuindo o vigor das sementes, evidenciando o efeito alelopático de folhas de *E. lugens* sobre a germinação do arroz em todas as concentrações testadas.

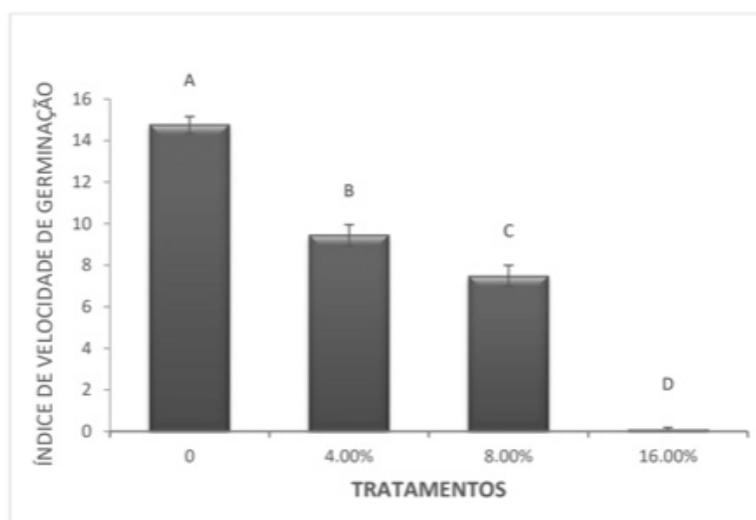


FIGURA 2 – Índice de velocidade de germinação de sementes de arroz sob efeito de extratos aquosos de *Eragrostis lugens*. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Nos estudos alelopáticos, a germinabilidade (índice final de sementes germinadas

ou percentagem de germinação) é um índice muito usado, embora não demonstre outros aspectos do processo de germinação, como atrasos, já que envolve apenas resultados finais, ignorando períodos de germinação inativa no decorrer do bioensaio. Em decorrência disso, muitas vezes o efeito alelopático não é observado sobre a germinabilidade, mas sim, sobre a velocidade de germinação (CHIAPUSIO *et al.* 1997, MAULI *et al.* 2009; FERREIRA E AQUILA, 2000). Tais efeitos podem ser observados no presente trabalho onde o índice de velocidade de germinação apresentou resultados mais significativos quando comparado à percentagem de germinação.

Os extratos aquosos de *E. lugens* também interferiram no crescimento inicial do arroz, com redução e/ou inibição no comprimento da parte aérea e do sistema radicular, sendo que com o aumento da concentração do extrato, a redução no crescimento mostrou-se mais expressiva (FIGURA 3). O comprimento da parte aérea reduziu significativamente em todos os tratamentos (Figura 3-A). Para o comprimento radicular não houve diferença significativa entre os tratamentos controle e 4,0 %, porém, ocorreu uma diminuição drástica no comprimento das radículas nos tratamentos 8,0 % e 16,0 %, em comparação com os demais, com diferença estatística (Figura 3-B). Tais resultados corroboram com os observados por Borges *et al.* (2016), nos quais extratos aquosos de *Eragrostis plana* interferiram negativamente no crescimento inicial de feijão-miúdo e cornichão, com redução e/ou inibição no comprimento da parte aérea e do sistema radicular, sendo o segundo mais sensível aos aleloquímicos. Em concordância, Ghebrehiwot *et al.* (2013), testando o efeito alelopático de extratos aquosos de *Eragrostis curvula*, observaram efeitos negativos dos mesmos sobre o crescimento inicial de alface em todas as concentrações testadas (2,0, 10,0, 25,0 e 40,0 %), sendo que, nas concentrações mais altas (25,0 e 40,0 %), ocorreu a completa inibição do crescimento radicular.

Essa resposta diferente da parte aérea em relação à radicular submetidas aos extratos pode ser ocasionada pelas estruturas próprias de cada órgão (DE CONTI & FRANCO, 2011). Dentre os sistemas das plantas o radicular é o mais sensível à ação de aleloquímicos, porque o seu alongamento depende das divisões celulares que, se inibidas, comprometem o seu desenvolvimento normal (HOFFMANN *et al.* 2007).

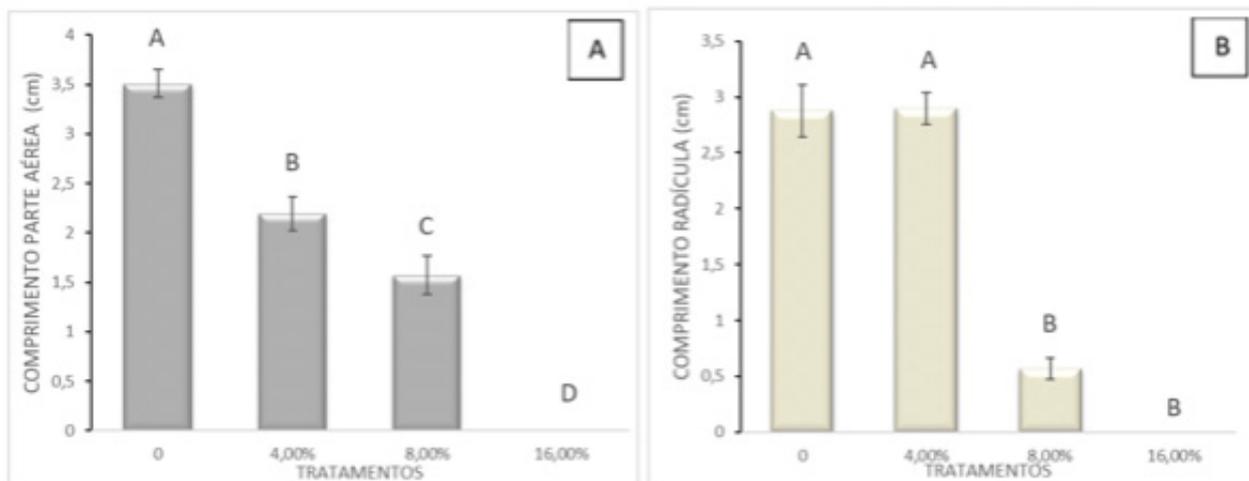


FIGURA 3- Crescimento inicial de plântulas de arroz sob efeito de extratos aquosos de *Eragrostis lugens*. A – Parte aérea (cm); B- Radícula (cm). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

O retardamento do crescimento ou da germinação pode ser descrito como mecanismo de seleção. Se o desenvolvimento das outras espécies é prejudicado, a espécie favorecida pode estabelecer sua prole, evitando a pressão de competição. Assim, os mecanismos a que são submetidos os cultivos, podem não ser somente de competição, mas causados por outras plantas cultivadas ou silvestres anteriormente presentes (GOETZE, 2004).

#### 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstra que o extrato de folhas de *Eragrostis lugens* apresenta efeito alelopático reduzindo e/ou inibindo a germinação de sementes, o índice de velocidade de germinação e o desenvolvimento inicial das plântulas de arroz, em uma relação concentração dependente. No que se refere ao crescimento, a parte radicular mostrou-se mais sensível aos aleloquímicos quando comparada à parte aérea.

#### REFERÊNCIAS

BORGES, B. T., et al. **Efeito alelopático de *Eragrostis plana* Nees na germinação e no crescimento de duas forrageiras.** Anais do VII Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão – Universidade Federal do Pampa, 2016.

CANTO-DOROW, T. S. **Caracterização de espécies de poáceas infestantes em lavoura de arroz.** In: I Seminário sobre manejo de plantas daninhas de difícil controle. GIPHE, 2011. **Prancha de identificação de espécies em campo**, UFSM– Santa Maria, 2011.

CHARDAKOV, S.: **Regime hydrique du cotonnier et determination des heures optimales d'irrigation.** Acad. Sci. Uzbek (S. S. S. R.) Tashkent, 1953.

CHIAPUSIO, G., et al. Do germination indices adequately reflect allelochemical effects on the

germination process? **Journal of Chemical Ecology** 23(1):2445-2453, 1997.

COSTA, C.C. et al. **Efeito do herbicida metamifop no controle de *Eragrostis lugens* em arroz irrigado**. Anais VIII Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, Santa Maria, 2013.

DE CONTI, D.; FRANCO, E.T.H. Efeito alelopático de extratos aquosos de *Casearia sylvestris* Sw. na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Agrociência** 17(2-4) 193-203, 2011.

DORNELLES, S.H.B. **Caracterização de acessos de arroz vermelho do Rio Grande do Sul por descritores morfológicos e microsatélites**. 2009, 101 f. Tese (Doutorado em Agronomia)- Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, Santa Maria, 2009.

FERNANDEZ, C., et al. Potencial allelopathic effect of ***Pinus halepensis*** in the secondary succession: an experimental approach. *Chemoecology*16:97-105, 2006.

FERREIRA, A.G.; BORGUETTI, F. **Germinação do básico ao aplicado**. Artmed, Porto Alegre, 323 p., 2004.

FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, n.1, p.175-204, 2000.

FERREIRA, N.R., MEDEIROS, R.B.; SOARES, G.L.G. Potencial alelopático do capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) na germinação de sementes de gramíneas perenes estivais. **Revista Brasileira de Sementes** 30(2):43-59., 2008.

FIORENZA, M. et al. Análise fitoquímica e atividade alelopática de extratos de *Eragrostis plana* Nees (capim-annoni). **Iheringia Série Botânica**71(2):193-200, 2016.

FLECK, N.G. **Controle de plantas daninhas na cultura do arroz irrigado através da aplicação de herbicidas com ação seletiva**. Porto Alegre: Ed. do autor, 32 p., 2000.

GHEBREHIWOT, M.; AREMU, A.O.; VAN STADEN, J. Evaluation of the allelopathic potential of five South African mesic grassland species. **Plant Growth Regulation**. 72 (2): 155-162, 2013.

GOETZE, M.; THOMÉ, G. C. H.; Efeito alelopático de extratos de *Nicotiana tabacum* E *Eucalyptus* **R. bras. Agrociência**, v. 10, n. 1, p. 43-50, 2004.

HOFFMANN, C.E.F., et al. Atividade alelopática de *Nerium oleander* L. e *Diefenbachia picta* Schott em sementes de *Lactuca sativa* L. e *Bidens pilosa* L. **Revista de Ciências Agroveterinárias** 6(1):11-21, 2007.

LABOURIAU, L.G.; VALADARES, M.E.B. **On the germination of seeds *Calotropis procera* (Ait.) Ait.f.** Anais da Academia Brasileira de Ciências, v.48, n.2, p.263-284, 1976.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMa, 531P, 2000.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science, Madison**, v. 2, n. 1, 176-177p., 1962.

MAULI, M.M., et al. Alelopatia de *Leucena* sobre soja e plantas invasoras. **Semina: Ciências Agrárias** 30(1):55-62, 2009.

SOARES, G.L.G. Inibição da germinação e do crescimento radicular de alface (cv. Grand Rapids) por extratos aquosos de cinco espécies de Gleicheniaceae. **Floresta e Ambiente**. 7:190-197, 2000.

## AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DE *COMBRETUM LEPROSUM* MART.: TESTE *ALLIUM CEPA*

### **Raidan Costa Rodrigues**

Centro Universitário UNINOVAFAPI  
Teresina – Piauí

### **Valéria Moura de Carvalho**

Centro Universitário UNINOVAFAPI  
Teresina – Piauí

### **Jadielson da Silva Santos**

Universidade Federal do Piauí (UFPI)  
Teresina – Piauí

### **Brenda Lois Barros dos Santos**

Centro Universitário UNINOVAFAPI  
Teresina – Piauí

### **Andressa Jordanne Pereira Ramos**

Centro Universitário UNINOVAFAPI  
Teresina – Piauí

### **Cairo Hilbert Santos de Melo**

Universidade Federal do Piauí (UFPI)  
Teresina – Piauí

### **Juliane Moreira Ramos**

Centro Universitário UNINOVAFAPI  
Teresina – Piauí

### **Elizângela de Carvalho Nunes**

Centro Universitário UNINOVAFAPI  
Teresina – Piauí

### **Sâmya Katya Barros Guimarães**

Centro Universitário UNINOVAFAPI  
Teresina – Piauí

### **Wanderson Ferreira Martins**

Centro Universitário UNINOVAFAPI  
Teresina – Piauí

### **Adão Correia Maia**

Centro Universitário UNINOVAFAPI  
Teresina – Piauí

### **Kelly Maria Rêgo da Silva**

Faculdade Mauricio de Nassau  
Teresina – Piauí

### **Mateus Sávio Amorim**

Faculdade Mauricio de Nassau  
Teresina – Piauí

### **Antonio Lima Braga**

Faculdade Mauricio de Nassau  
Teresina – Piauí

**RESUMO:** O *Combretum leprosum* Mart. também vulgarmente vem sendo utilizada como planta medicinal por sua capacidade cicatrizante, por prevenir irritações cutâneas sem limpeza de feridas, ajudar na contenção de hemorragias, útil como sedativo, antitússico, expectorante e antiparasitária. O *Allium cepa* é um teste utilizado frequentemente, sensível para identificar a existência de diversas substâncias que possam causar alterações cromossômicas e de baixo custo. Os bioensaios vegetais são sistemas bem definidos e utilizados para monitoramento e análise da genotoxicidade de substâncias. O presente estudo tem como objetivo verificar a genotoxicidade de extrato aquoso das raízes de *Combretum leprosum*

Mart. através de teste de *Allium cepa*. O experimento foi realizado com extratos das raízes de *C. leprosum* Mart., tendo como controle água destilada. Seguindo o protocolo, realizaram-se os esfregaços em lâminas aguardando a secagem em temperatura ambiente, e logo após a coração e nova secagem, observou-se na objetiva de 40X a contagem de 5000 células. A exposição dos extratos das raízes de *Combretum leprosum* Mart. demonstraram um número significativo de anormalidades nucleares nas células, influenciando diretamente na frequência de aberrações cromossômicas, em relação ao número de atrasos, pontes e fragmentos e micronúcleos. Os resultados obtidos demonstraram que o extrato das raízes de *Combretum leprosum* Mart. possui atividade genotóxica no teste *Allium cepa*. No entanto, mais estudos são necessários para verificar o processo de interação bioquímica e possíveis efeitos da substância estudada.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Combretum leprosum* Mart., Planta medicinal, Genotoxicidade, *Allium cepa*.

**ABSTRACT:** The *Combretum leprosum* Mart. also commonly used as a medicinal plant because of its healing capacity, to prevent skin irritations without cleaning wounds, to help contain hemorrhages, useful as sedative, antitussive, expectorant and antiparasitic. *Allium cepa* is a test used frequently, sensitive to identify the existence of several substances that can cause chromosomal changes and of low cost. Plant bioassays are well defined systems used for monitoring and analyzing the genotoxicity of substances. The present study aims to verify the genotoxicity of aqueous extract of the roots of *Combretum leprosum* Mart. through the *Allium cepa* test. The experiment was carried out with extracts of the roots of *Combretum leprosum* Mart., With control as distilled water. Following the protocol, smears were performed on slides waiting for drying at room temperature, and shortly after the heart and redrying, a count of 5000 cells was observed on the 40X objective. The exposition of extracts of the roots of *Combretum leprosum* Mart. demonstrated a significant number of nuclear abnormalities in the cells, directly influencing the frequency of chromosomal aberrations, in relation to the number of delays, bridges and fragments and micronuclei. The results obtained showed that the extract of the roots of *Combretum leprosum* Mart. has genotoxic activity in the *Allium cepa* test. However, more studies are needed to verify the process of biochemical interaction and possible effects of the substance under study.

**KEYWORDS:** *Combretum leprosum* Mart., Medicinal plant, Genotoxicity, *Allium cepa*.

## INTRODUÇÃO

O *Combretum leprosum* Mart. também vulgarmente conhecida como mofumbo, carne-de-vaca e cipoaba, vem sendo utilizada como planta medicinal por sua capacidade cicatrizante, por prevenir irritações cutâneas sem limpeza de feridas, ajudar na contenção de hemorragias, útil como sedativo (PIETROVSKI et al., 2006), antitússico, expectorante (AGRA et al., 2007), atividade antiparasitária em cepas de

promastigotas de *Leishmania amazonenses* (TELES et al. 2011).

O *Allium cepa* é um dos testes que vem sendo utilizado frequentemente por vários pesquisadores, por ser um ensaio bastante sensível para identificar a existência de diversas substâncias que possam causar alterações cromossômicas, em soma, possui um baixo custo para execução. É um modelo *in vivo* pertinente e efetivo, no qual as raízes crescem em contato direto com o analito de interesse, permitindo que os possíveis danos ao DNA das células possam ser observados (TEDESCO; LAUGHINGHOUSE, 2012).

A genética toxicológica visa identificar e analisar as interações de substâncias químicas sobre o material genético dos organismos, que promovem alterações significativas nos sistemas biológicos, para tanto podem ser utilizadas várias análises genéticas. Bioensaios de mutagenicidade em plantas vem sendo realizados há muitos anos. Os bioensaios vegetais são sistemas bem definidos e utilizados para monitoramento e análise da genotoxicidade de substâncias (LIMA et al., 2011; MATOS, 2009).

De acordo com Mattos e colaboradores (2016) o uso de bioindicadores como organismos testes através de bioensaios para detectar tanto a genotoxicidade quanto mutagenicidade de extratos que se ligam quimicamente com o material genético está cada vez mais presente em pesquisas.

Segundo Luz e colaboradores (2012), aberrações cromossômicas (AC) são qualificadas por mudanças em qualquer estrutura cromossômica ou no número total de cromossomos, sendo causados por agentes clastogênicos e aneuploidogênicos. AC estruturais podem ser provocadas por várias condições, como rupturas ou trocas de material cromossômico, inibição da síntese de DNA e danos na replicação do DNA.

As anormalidades nucleares (AN) são caracterizadas por alterações morfológicas nos núcleos interfásicos, muitas vezes, na forma de núcleos lobulados, brotos nucleares, células polinucleares e minicélulas (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME; ANGELIS; MARIN-MORALES, 2008; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2009).

Os micronúcleos (MN) vêm sendo considerados por vários autores como o mais efetivo e simples fator para analisar efeitos mutagênicos, devido ao fato dos MN culminarem a danos nas células parentais, sendo facilmente observados em células (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Diante das informações expostas acima, o presente estudo tem como objetivo verificar a genotoxicidade de extrato aquoso das raízes de *Combretum leprosum* Mart. através de teste de *Allium cepa*.

## METODOLOGIA

Para realização do estudo os bulbos foram colocados em água destilada para

crescimento das raízes até elas atingirem um tamanho de aproximadamente 1cm. Após aparecimento de raízes os bulbos foram expostos em contato com os extratos das raízes de *Combretum leprosum* Mart. durante um período de 48 horas. Ao término desse período, foi retirado as raízes com a coifa, com um tamanho por volta de 2cm. Aproximadamente seis raízes foram mantidas nos bulbos para realização do processo de controle, onde os mesmos retornavam para água destilada durante um período de 24 horas, para avaliarmos a capacidade da célula executar o processo de reparo após injúria.

Os meristemas radiculares, foram armazenados em microtubos contendo fixador Carnoy por 24 horas e logo após, as raízes foram lavadas em água destilada por três vezes e armazenadas em álcool 70% sob refrigeração até a confecção das lâminas. Foram feitos esfregaços em laminas aguardando a secagem em temperatura ambiente, e logo após a coração e nova secagem, observou-se em microscopia óptica na objetiva de 40X a contagem de 5000 células, para registro de células com anomalias no ciclo mitótico.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado contendo as aberrações cromossômicas observadas foram dispostas na tabela abaixo:

Aberrações Cromossômicas (AC)				
Atrasos	Pontes	Fragmentos	Cromossomos Soltos	Micronúcleos (MN)
6%	3%	3%	0	2%

Tabela 1. Aberrações cromossômicas observadas nas amostras dos meristemas expostos aos extratos das raízes de *Combretum leprosum* Mart. após 48 h.

Fonte: Autoria própria (2017)

A exposição dos extratos das raízes de *Combretum leprosum* Mart. demonstraram uma significativa AN nas células, influenciando diretamente na AC descritas na tabela 1, em relação ao número de atrasos, pontes e fragmentos e MN nas amostras realizadas.

O aumento na ocorrência de MN também permite identificar uma eventual mutação nas células que são expostas a uma variada gama de agentes genotóxicos, expressando-se através dos danos no cromossomo como MNs (FLORES; YAMAGUCHI, 2008).

Segundo Combes (1992) a genotoxicidade dar-se no momento em que a capacidade de replicação e de levar informação do DNA é alterada, conseqüentemente levando a danos no DNA, que podem resultar em efeitos mutagênicos e carcinogênicos.

Nas amostras observaram-se alterações nas divisões celulares, com a presença de AC, podendo classificar o extrato de *Combretum leprosum* Mart. neste ensaio uma substância genotóxica.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que o extrato das raízes de *Combretum leprosum* Mart. possui atividade genotóxica no teste *Allium cepa*. No entanto, mais estudos são necessários para verificar o processo de interação bioquímica e possíveis efeitos da substância estudada.

## REFERENCIAS

AGRA, M. F. et al. **Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”**, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v.111, p.383-95, 2007.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. **Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes**. *Chemosphere*, v. 72, n. 5, p. 722–725, 2008.

COMBES, R.D. **Genotoxicity testing: recent advances and future trends**. *Chemistry & Industry*. V. 24, p. 950-954, 1992.

DE LIMA, Érica Ribeiro et al. **AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DO EXTRATO ETANÓLICO E TRITERPENO LUPANO OBTIDOS DE COMBRETUM LEPROSUM CONTRA MICROORGANISMOS**. *SABER CIENTÍFICO*, v. 3, n. 1, p. 53-69, 2011.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. **Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agente – Trifluralin herbicide**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 72, n. 6, p. 1680–1686, 2009.

FLORES, Mônica; YAMAGUCHI, Mirian Ueda. **Teste do micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica**. *Saúde e Pesquisa*, v. 1, n. 3, p. 337-340, 2009.

LEME, D. M.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. **Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells**. *Aquatic Toxicology*, v. 88, n. 4, p. 214–219, 2008.

LUZ, A.C et al. **Avaliação do potencial citotóxico e genotóxico de *Plantago major* L. em sistemas teste *in vivo***. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 14, n. 4, p.635-642, 2012.

MATOS, F.J.A. **Introdução fitoquímica experimental**. Fortaleza: Edições UFC, 3. ed., p.150. 2009.

MATTOS, M; et al. **GENOTOXICIDADE E CITOTOXIDADE DO DEFENSIVO AGRÍCOLA TRIFLUMURON NO BIOENSAIO DE *ALLIUM CEPA***. *Anais da Jornada de iniciação científica*, 2016.

PIETROVSKI, E. F. et al. **Topical anti-inflammatory activity of *Eugenia brasiliensis* Lam. (*Myrtaceae*) leaves**. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.60, p.479-487, 2008.

TELES, Carolina B. G et al . **Activity of the Lupane isolated from *Combretum leprosum* against *Leishmania amazonensis* promastigotes**. *J. Braz. Chem. Soc.*, São Paulo , v. 22, n. 5, p. 936-942, May 2011 .

TEDESCO, S. B.; LAUGHINGHOUSE, H. D. **Bioindicator of genotoxicity: the *Allium cepa* test**. In: SRIVASTAVA, J. (Ed.). *Environmental contamination*. Rijeka: InTech, 2012. p. 137-156.

## AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE ALECRIM (*ROSMARINUS OFFICINALIS*) E CHÁ VERDE (*CARMELLIA SINENSIS*) EM LINGUIÇAS FRESCAL BOVINA

**Thaís Cidarta Melo Barbosa**

Universidade Federal da Paraíba  
João Pessoa- Paraíba

**Juliana Nobrega Clemente**

Universidade Federal de Campina Grande  
Pombal -Paraíba

**Karina da Silva Chaves**

Universidade Federal do Mato Grosso  
Barra do Garças - Mato Grosso

**Sthelio Braga da Fonseca**

Universidade Federal de Campina Grande  
Pombal -Paraíba

**Bruno Raniere Lins de Albuquerque  
Meireles**

Universidade Federal de Campina Grande  
Pombal -Paraíba

**RESUMO:** A composição química dos embutidos cárneos torna-os susceptíveis às alterações sensoriais e nutricionais pelo processo de oxidação lipídica. Uma alternativa para estender a vida de prateleira é a adição de antioxidantes naturais, uma vez que a utilização está associada aos benefícios proporcionados a saúde e a preservação das características dos alimentos. Neste contexto, objetivou-se avaliar o potencial antioxidante dos extratos de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e chá verde (*Carmellia sinensis*) na estabilidade oxidativa de linguiça frescal bovina. O teor de fenólicos

totais dos extratos vegetais foi avaliado por Folin-Ciocalteu e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As linguiças foram preparadas utilizando as formulações: (F1): sem antioxidante; (F2): antioxidante BHT; (F3): extrato de alecrim e (F4): extrato de chá verde, nas quais foram realizadas análises físico-químicas e de oxidação lipídica no período de 30 dias de armazenamento. Com relação ao teor de fenólicos totais, os extratos revelaram resultados de 464,52 mg EAG/g para o alecrim e 266,47 mg EAG/g para o chá verde. Todas as formulações das linguiças apresentaram resultados dentro dos parâmetros físico-químicos preconizados em legislação vigente, com valores médios de 69,20; 18,10 e 5,25% para umidade, proteína, lipídios, respectivamente. A avaliação da oxidação lipídica indicou que o antioxidante BHT inibiu 99% dos efeitos indesejáveis da oxidação, enquanto os antioxidantes naturais apresentaram inibições para alecrim de 43,2% e chá verde de 63,9%. Dessa forma, os extratos vegetais mostraram-se eficientes no controle da oxidação em linguiça frescal bovina.

**PALAVRAS-CHAVE:** compostos bioativos, oxidação lipídica, produtos cárneos.

**ABSTRACT:** The chemical composition of meat sausages making them susceptible to sensorial and nutritional changes by the lipid oxidation process. An alternative to extending shelf life is

the addition of natural antioxidants, since use is associated with the health benefits and preservation of food characteristics. In this context, the objective was to evaluate the antioxidant potential of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis*) and green tea (*Carmellia sinensis*) on the oxidative stability of fresh bovine sausage. The total phenolic content of the plant extracts was evaluated by Folin-Ciocalteu and high performance liquid chromatography (HPLC). The sausages were prepared using the formulations: (F1): without antioxidant; (F2): antioxidant BHT; (F3): rosemary extract and (F4): green tea extract, in which physicochemical and lipid oxidation analyzes were carried out within 30 days of storage. With respect to the total phenolics content of the extracts showed results of 464.52 mg EAG / g for rosemary and 266.47 mg EAG / g for green tea. All the formulations of the sausages presented results within the physico-chemical parameters recommended in current legislation, with average values of 69.20; 18.10 and 5.25% for moisture, protein, lipids, respectively. The evaluation of the lipid oxidative indicated that the antioxidant BHT inhibited 99% of the undesirable effects of the oxidation, whereas the natural antioxidants showed inhibitions for rosemary of 43.2% and green tea of 63.9%. Thus, the extracts were efficient in the control of oxidation in fresh bovine sausage.

**KEYWORDS:** bioactive compounds, lipid oxidation, meat products.

## 1 | INTRODUÇÃO

A carne bovina é um alimento extremamente nutritivo, rico em proteínas, aminoácidos essenciais, vitaminas do complexo B e minerais como ferro e zinco (MEDEIROS et al., 2015). Uma estratégia viável para prolongar a vida útil, produzir alimentos proteicos com alta qualidade e agregar valor a matéria-prima é a elaboração de produtos cárneos (SILVA et al., 2017).

Em decorrência do fácil preparo, aceitabilidade e por possuir nutrientes que saciam a fome rapidamente, a linguiça frescal tornou-se um produto potencial no mercado para comercialização e consumo. De acordo com a legislação brasileira, entende-se por linguiça o produto cárneo industrializado, obtido de carnes de animais de açougue, adicionados ou não de tecido adiposo, ingredientes, embutidos em envoltório natural ou artificial, e submetido ao processo tecnológico adequado (BRASIL, 2000).

Os embutidos cárneos possuem uma composição rica em lipídios que confere características desejáveis, como suculência, sabor e maciez às carnes. No entanto, este constituinte químico torna os produtos cárneos susceptíveis à oxidação lipídica, responsável pela degradação de ácidos graxos essenciais e do surgimento de odores e de sabores desagradáveis (ranço), além da formação de compostos potencialmente tóxicos ao organismo humano (LIMA, 2016). Em contraponto, a indústria de alimentos tem buscado diversos métodos para estender ao máximo a vida de prateleira dos produtos. Uma das substâncias utilizadas para este fim são os antioxidantes, cuja finalidade consiste em inibir ou retardar a oxidação dos componentes lipídicos.

Vários tipos de antioxidantes sintéticos, como hidroxitolueno butilado (BHT),

hidroxianisol butilado (BHA), propil galato (PG) e terc butil hidroquinona (TBHQ) há muito tempo são utilizados na indústria de carnes para retardar a oxidação (MARIUTTI et al., 2011). Nos últimos anos pesquisas se intensificaram, comprovando que estes compostos apresentaram efeitos tóxicos e carcinogênico (OLIVEIRA, 2012). Assim, o interesse na utilização de antioxidantes naturais, proveniente de extratos vegetais, surge como alternativa viável, visto que possuem propriedades antimicrobianas, antioxidantes e estabilizantes para os alimentos, além da redução dos riscos de várias doenças para os consumidores (SINGER et al., 2012).

As ervas alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e chá verde (*Carmellia sinensis*) são conhecidas por possuírem características antioxidantes efetivas nos alimentos, uma vez que são fontes de compostos fenólicos, substâncias naturais extraídas de material vegetal, cuja aplicação na indústria de alimentos deve-se às suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes (HONORATO et al., 2013). Além disso, atuam na proteção do corpo humano contra os radicais livres, inibindo doenças crônicas (SERAFINI, 2013). Deste modo, as pesquisas por antioxidantes naturais têm aumentado, tornando-se uma ferramenta no controle de processos oxidativos em alimentos.

Dessa forma, objetivou-se avaliar a estabilidade oxidativa de linguiça frescal bovina adicionada de extratos de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e chá verde (*Carmellia sinensis*) durante 30 dias de armazenamento.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologia de Carne, Ovos e Pescado da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG/UATA), utilizando a etapas descritas nesta metodologia.

### 2.1 Obtenção e avaliação dos extratos vegetais

Os extratos vegetais foram obtidos utilizando amostras de chá verde (*Carmellia sinensis*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*), com auxílio dos solventes de extração aquoso (100% água), alcoólico (100% etanol) e o hidroalcoólico (70% etanol e 30% água). Os extratos foram preparados seguindo a metodologia descrita por Cordeiro et al. (2012), a partir de 10 g de erva para 100 ml de solvente, onde passou por um processo de agitação mecânica por quatro horas. Em seguida, houve a filtração em papel filtro e secagem em estufa de circulação a 40°C até estarem completamente secos. Após a secagem, foram armazenados sob refrigeração e ao abrigo da luz.

O teor de fenólicos totais presentes nos extratos de chá verde e alecrim foram verificados por meio do método de Folin-Ciocalteu segundo Rossi e Singleton (1965), com modificações de Silva et al. (2006). O ácido gálico foi usado na curva padrão e os resultados foram expressos em termos de ácido gálico equivalente (mg GAE/g

extrato).

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alto desempenho (HPLC) Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com um injetor automático Rheodyne 7125i e um detector UV/VIS. As colunas utilizadas foram uma coluna Shimadzu LC-18 (25 cm x 4,6 mm, 5 $\mu$ m particle size, da Supelco, Bellefonte, PA) e uma pré-coluna C-18 ODS Shimadzu. Para a identificação dos compostos fenólicos, as amostras foram eluídas com um sistema gradiente que consiste em solvente A (2% ácido acético, v/v) e solvente B (acetonitrila:metanol, 2:1, v/v), utilizados como fases móveis, com um fluxo de 1 mL/min. A temperatura da coluna foi mantida a 25 °C e o volume de injeção foi de 20  $\mu$ L. O sistema de gradiente iniciou-se a partir de 90% A a 0 min, 88% A em 3 min, 85% A em 6 min, 82% A em 10 min, 80% A em 12 min, 70% A em 15 min, 65% A em 20 min, 60% A em 25 min, 50% A em 30-40 min, 75% A em 42 min e 90% A em 44 min, segundo Meireles (2017). A corrida cromatográfica total foi de 50 minutos. Os picos dos compostos fenólicos foram monitorizados a 280 nm. Os compostos fenólicos foram identificados por meio da comparação dos tempos de retenção com os padrões de ácidos fenólicos e flavonoides, sendo quantificados em concentrações de mg/mL a partir de curvas de calibração e os cromatogramas foram registrados no software LabSolutions Data System.

## 2.2 Elaboração e caracterização da linguiça frescal bovina

Foram elaboradas quatro formulações de linguiça frescal bovina com duas repetições de cada tratamento, com as formulações: F1- sem adição de antioxidante, F2 - adição do antioxidante BHT (0,003%), F3 - adição do extrato de alecrim (0,006%) e F4 - adição do extrato de chá verde (0,021%). As dosagens dos antioxidantes adicionados nas linguiças foram determinadas conforme resultados verificados em análise do teor de fenólicos totais e segundo estudos consoantes de Pereira (2009), Cordeiro et al. (2012) e a legislação brasileira para antioxidantes sintéticos (BRASIL, 2006).

Para obtenção das linguiças frescas a carne (corte coxão mole) e o toucinho foram submetidos à moagem, seguido da adição dos ingredientes descritos na Tabela 1 e de homogeneização manual. Posteriormente a emulsão cárnea foi embutida em tripa natural suína, sendo todos os tratamentos armazenados sob refrigeração de 0 a + 4 °C e submetidos ao estudo de vida de prateleira (DALMÁS, 2013).

Ingredientes (%)	F1 (Controle)	F2 (BHT)	F3 (Alecrim)	F4 (Chá verde)
Carne bovina	82,5	82,5	82,5	82,5
Toucinho	10	10	10	10
Sal refinado	1,5	1,5	1,5	1,5
Antioxidante	-	-	-	-
BHT	-	0,003	-	-

Alecrim	-	-	0,006	-
Chá verde	-	-	-	0,021
Pimenta	0,1	0,1	0,1	0,1
Alho	0,1	0,1	0,1	0,1
Realçador de sabor	0,1	0,1	0,1	0,1
Estabilizante	0,2	0,2	0,2	0,2
Sal de cura	0,2	0,2	0,2	0,2
Água gelada	5	5	5	5

Tabela 1. Formulações da linguiça frescal bovina

As linguiças frescas bovina foram caracterizadas obedecendo às metodologias descritas abaixo, com a realização das análises em triplicatas:

Composição Centesimal: os teores de umidade, cinzas e proteínas realizadas de acordo com a metodologia da AOAC (2012). O teor lipídico foi verificado seguindo os procedimentos de Folch et al. (1957). Os carboidratos foram estimados por diferença seguindo a metodologia do Instituto Adolpho Lutz (2008).

Oxidação lipídica: a oxidação lipídica dos produtos foi determinada durante 30 dias pelo método do ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com a metodologia descrita por Rosmini et al. (1996).

Análise estatística: os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando um delineamento inteiramente casualizado (DIC) e teste de média Tukey ao nível de 5% de significância, com auxílio do software estatístico ASSISTAT 7.7.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados verificados na análise de compostos fenólicos totais para o antioxidante sintético e os extratos naturais utilizando diferentes solventes de extração estão apresentados na Tabela 2.

Solventes de extração (%)	Teor de fenólicos totais*		
	Extrato de alecrim	Extrato de chá verde	BHT
Água	464,52 <sup>a</sup>	178,77 <sup>b</sup>	
Etanol	44,17 <sup>c</sup>	32,22 <sup>c</sup>	1332,34
Etanol/Água	145,30 <sup>b</sup>	266,47 <sup>a</sup>	

Tabela 2- Teor de fenólicos totais do antioxidante sintético e dos extratos vegetais

\* Os resultados estão expressos em mg EAG/g extrato para teor de fenólicos totais.

O extrato de alecrim utilizando solvente aquoso apresentou maior conteúdo de compostos fenólicos totais dentre os extratos vegetais analisados, já o extrato de chá

verde obtido com solvente hidroalcoólico conteve maior teor de compostos fenólicos, demonstrando assim que esses solventes foram mais eficientes na extração dessa classe de substâncias químicas. Para o antioxidante sintético BHT foi verificado o resultado de 1332,34 EAG/g de compostos fenólicos totais, apresentando conteúdo superior de compostos quando comparado com os demais tratamentos. A elevada quantidade de substâncias bioativas está relacionada à capacidade de retardar a deterioração, rancidez ou descoloração causada pela oxidação (HONORATO et al., 2013).

Na Tabela 3 e na Figura 1 estão apresentados os resultados verificados na identificação e a concentração dos compostos fenólicos encontrados nos extratos vegetais.

<b>Compostos fenólicos (mg/100g)</b>	<b>Extrato Aquoso de Alecrim</b>	<b>Extrato hidroalcoólico de Chá verde</b>
<b>Ácidos fenólicos</b>		
Ácido 3,4 dihidroxibenzoico	0,22	2,43
Ácido 4 Hidroxibenzoico	0,09	0,23
Ácido p-Cumárico	0,03	0,01
Ácido Siríngico	0,03	-
Ácido 2,5 dihidroxibenzoico	0,95	3,51
Ácido Vanílico	0,14	0,93
Ácido Felúrico	0,20	0,02
Ácido Elágico	0,07	-
Ácido Cafeico	0,23	2,43
Ácido transcinâmico	-	0,05
<b>Flavonoides</b>		
Rutina	0,23	0,21
Miricetina	0,29	0,74
Quercetina	0,04	0,02
Kampferol	0,02	-
Catequina	0,03	0,05
Crisina	0,05	0,21
Vanilina	-	0,14
<b>TOTAL</b>	<b>2,62</b>	<b>10,98</b>

Tabela 3- Identificação e quantificação dos compostos fenólicos por CLAE presentes nos extratos vegetais

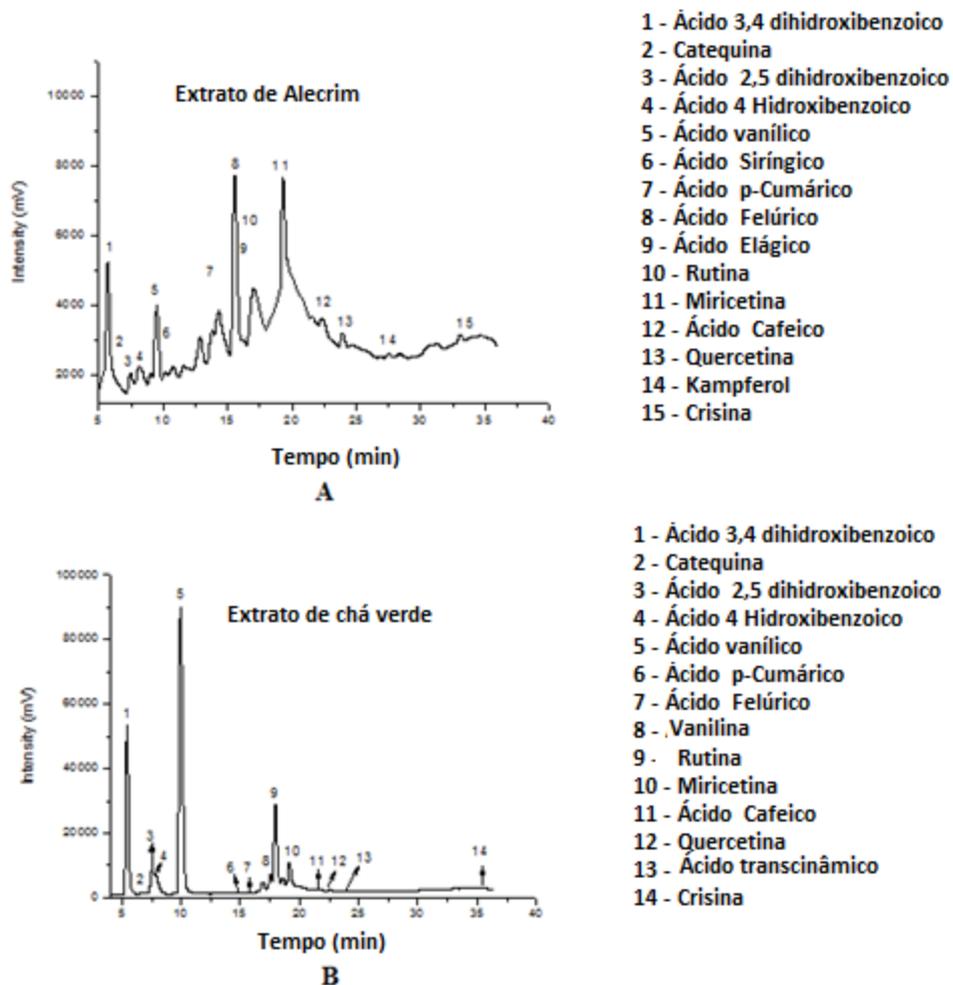


Figura 1 - Cromatograma do perfil dos compostos fenólicos

Os ácidos fenólicos identificados em maiores quantidades nos extratos de alecrim e chá verde foram o ácido 2,5 dihidroxibenzoico, o ácido 3,4 dihidroxibenzoico e o ácido Cafeico (Tabela 3, Figura 1).

O ácido 2,5-dihidroxibenzoico foi verificado em concentrações de 0,95 mg/g no extrato de alecrim e 3,51 mg/g no extrato de chá verde. O ácido está vinculado à atividade neuroprotetora, inibição da oxidação do LDL e na prevenção de doenças cardiovasculares (KABRA et al., 2014).

Os flavonoides são importantes compostos que possuem capacidade antioxidante atuando na proteção dos tecidos contra aos danos oxidativos, devido ao elevado potencial de oxidação e redução (COIMBRA, JORGE, 2012). Dentre os flavonoides identificados nos extratos vegetais, observou-se quantidades majoritárias de rutina e miricetina (Tabela 3, Figura 1).

A rutina é amplamente encontrada em alimentos de fontes vegetais. Nos extratos de alecrim e chá verde foram obtidos valores de 0,23 mg/g e 0,21 mg/g, respectivamente. Esse composto é considerado o mais importante da classe dos flavonoides, tendo em vista que apresenta propriedades de inibir o processo de formação de radicais livres em vários estágios e outras atividades biológicas como prevenção de doenças cardiovasculares e anticarcinogênica (LEE et al., 2011).

Os resultados obtidos para a caracterização físico-química da linguiça fresca bovina estão descritos na Tabela 4.

Parâmetros	F1 (Controle)	F2 (BHT)	F3 (Alecrim)	F4 (Chá verde)
Umidade (g/100 g)	69,46 <sup>a</sup> ±0,53	69,10 <sup>a</sup> ±0,53	68,87 <sup>a</sup> ±0,53	69,36 <sup>a</sup> ±0,53
Proteína (g/100 g)	17,37 <sup>b</sup> ±2,65	18,15 <sup>ab</sup> ±2,65	18,45 <sup>a</sup> ±2,65	18,44 <sup>ab</sup> ±2,65
Lipídios (g/100 g)	5,18 <sup>a</sup> ±0,25	5,33 <sup>a</sup> ±0,25	5,03 <sup>a</sup> ±0,25	5,44 <sup>a</sup> ±0,25
Carboidrato (g/100 g)	5,40 <sup>a</sup> ±0,80	4,91 <sup>a</sup> ±0,80	4,99 <sup>a</sup> ±0,80	4,01 <sup>a</sup> ±0,80
Cinzas (g/100 g)	2,57 <sup>a</sup> ±0,10	2,51 <sup>a</sup> ±0,10	2,65 <sup>a</sup> ±0,10	2,73 <sup>a</sup> ±0,10

Tabela 4- Parâmetros físico-químicos da linguiça fresca bovina

A umidade influencia nas características sensoriais, físico-químicas e microbiológicas dos produtos cárneos (SANTOS, 2016). O teor de umidade verificado no estudo para as diferentes formulações encontram-se de acordo com a legislação brasileira, que permite a quantidade máxima de umidade de 70 % em linguiça fresca. Já as proteínas presentes nos produtos cárneos desempenham importantes propriedades funcionais, sensoriais e nutricionais (UTRERA; ESTÉVEZ, 2012). Nos resultados verificados no estudo observa-se que todas as formulações permaneceram dentro dos limites estabelecidos pela legislação que admite para linguiça fresca no mínimo 12% de proteína no produto final (BRASIL, 2000).

As linguiças frescas apresentaram resultados semelhantes para o teor lipídico, identificando valores que variaram de 5,03 a 5,44%, não sendo verificada diferença significativa em relação às formulações analisadas. Como também os resultados permaneceram dentro dos limites estabelecidos pela Instrução Normativa N° 4 do MAPA (BRASIL, 2000). Os lipídios presentes nos produtos cárneos atribuem aos alimentos sabor e aroma agradável, melhora a textura e palatabilidade. Todavia, este constituinte químico tornam os produtos susceptíveis à oxidação lipídica, diminuindo o tempo de vida útil do alimento (LIMA, 2016).

Em relação ao conteúdo de resíduo mineral fixo os resultados obtidos nesta pesquisa variaram de 2,51 a 2,73%, não apresentando diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) entre as formulações avaliadas. Para o constituinte carboidrato verificou-se que as formulações de linguiças também não apresentaram diferença significativa.

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados da oxidação lipídica na linguiça fresca, observados pela formação do malonaldeído durante o armazenamento 30 dias.

Formulações	Estudo da vida de prateleira	
	0 (dias)	30 (dias)
F1 (Controle)	0,3418 <sup>bB</sup> ± 0,24	0,6441 <sup>bA</sup> ± 1,22
F2 (BHT)	0,4099 <sup>aA</sup> ± 0,18	0,4064 <sup>bA</sup> ± 0,39
F3 (Alecrim)	0,4216 <sup>aB</sup> ± 0,28	1,0733 <sup>aA</sup> ± 1,11
F4 (Chá verde)	0,4114 <sup>aB</sup> ± 0,18	0,5893 <sup>bA</sup> ± 0,51

Tabela 5. Estudo da vida de prateleira de linguiça frescal bovina adicionada de diferentes antioxidantes

\* Letras maiúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ); Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste Tukey ( $P < 0,05$ )

A oxidação lipídica é uma reação em cadeia complexa ocasionada por radical livre que envolve o consumo de oxigênio molecular e afeta principalmente os ácidos graxos insaturados dos lipídios presentes nos produtos cárneos, levando ao desenvolvimento de rancidez e alterações nas características sensoriais e nutricionais. A extensão da oxidação é afetado por vários fatores, como catalisadores de metais, mioglobina, enzimas, atividade de água, composição de gordura, enzimas oxidativas, processamento e armazenamento (VIEIRA et al., 2017).

Os resultados obtidos demonstram que ao final do estudo de vida de prateleira com 30 dias, as formulações F1, F3 e F4 diferiram estatisticamente, apresentando um aumento na oxidação lipídica em relação ao tempo inicial. Bem como, observou-se que as linguiças adicionadas de extrato de alecrim obtiveram maiores resultados de TBARS, indicando uma maior oxidação para a formulação, podendo está relacionado à menor quantidade de compostos fenólicos presentes no extrato de alecrim verificado nos resultados descritos na Tabela 3 deste estudo.

#### 4 | CONCLUSÃO

Os extratos vegetais revelaram maior conteúdo de compostos fenólicos totais na extração aquosa para o alecrim e hidroalcólico para o chá verde, demonstrando serem importantes fontes de compostos bioativos, através da identificação e quantificação de composto fenólicos e flavonoides (ácido 2,5 dihidroxibenzoico, o ácido 3,4 diroxibenzoico, ácido, rutina e a mericetina).

Os resultados da caracterização físico-química das linguiças frescas adicionadas de diferentes antioxidantes atenderam as normas estabelecidas pela legislação para linguiça frescal.

Durante o estudo de vida de prateleira a oxidação lipídica foi inibida com maior eficácia pela adição do antioxidante BHT. Porém, o extrato vegetal de chá verde evidenciou a capacidade de inibir a oxidação lipídica, favorecendo a substituição de substâncias artificiais por naturais na indústria de alimentos.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE JÚNIOR, F. P. A.; LIMA, B. T. M.; ALVES, T. W. B.; MENEZES, J. S.; MENEZES, M. E. S. *Staphylococcus aureus* como Agente Etiológico de Doenças Transmitidas por Alimentos: Dados Epidemiológicos, Principais Alimentos, Fatores Causais, Toxinas, Sintomatologia e Medidas Profiláticas. **II Congresso Brasileiro de Ciências da Saúde**, 2017.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of AOAC International**, (19th ed.). Washington, D.C.: AOAC International. v 19, 2012.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) -Instrução Normativa nº 51. **Regulamento Técnico de Atribuição de Aditivos, e seus Limites das Seguintes Categorias de Alimentos: Categoria 8: Carne e Produtos Cárneos**, 29 de dezembro de 2006.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) -Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. **Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água**, 2003.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) - **Instrução Normativa nº 4. Anexo III - Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Linguiça, 31 de março de 2000.**
- CECCHI, Heloisa M. **Fundamentos Teóricos e Práticos em Análise de Alimentos**. 2. ed. Campinas:UNICAMP, . 208p. 2003.
- Coimbra MC, Jorge N. Fatty acids and bioactive compounds of the pulps and kernels of Brazilian palm species, guariroba (*Syagrus oleracea*), jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**. n.92, p.679-684, 2012.
- CORDEIRO, A. M. T. M.; MEDEIROS, M. L.; SANTOS, N. A.; SOLEDADE, L. E. B.; PONTES, L. F. B. L.; SOUZA, A. L.; QUEIROZ, N.; SOUZA, A. G. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract: Thermal study evaluation of the antioxidante effect on vegetable oils. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 2, p. 98-104, 2012.
- DALMÁS, P. S. Processamento de Carne Caprina e Ovina. **Embrapa Semiarido**, Petrolina, 2013.
- FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v 226, p. 497-509, 1957.
- GRAU, R.; HAMM, R. Eine einfache method zur bestimmung der wasserbindung in muskel, **Naturwissenschaften**, v. 40, p. 29-30, 1953.
- GUERRERO, A., VALERO, M. V., CAMPO, M. M. & SAÑUDO, C. Some factors that affect ruminant meat quality: from the farm to the fork. Review. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v.35, p.335-347, 2013.
- HOFFMANN, K.; HAMM, R.; BLUCHEL, E. Neus ubes die bestimmung der wasserbinding des nut hiefl filterpaperpremethods. **Fleishwirtsch**, v.62, p. 87-94, 1982.
- HONORATO, T. C.; BATISTA, E.; NASCIMENTO, K. O.; PIRES, T. Aditivos alimentares: aplicações e toxicologia. **Revista Verde**, v. 8, p. 01-11, 2013.
- INSTITUTO ADOLPHO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4ª Edição, 1ª Edição Digital. São Paulo: Instituto Adolpho Lutz, 1020p., 2008.
- KABRA, M.; BHANDARI, S.; SHARMA, A.; GUPTA, R. Evaluation of anti-parkinson's activity of gentisic acid in different animal models. **Journal of Acute Disease**, v. 3, p. 141-144, 2014.

LEE, C.; CHEN, L.; CHANG, T.; KE, W.; LO, Y.; WANG, C. The correlation between skin care effects and phytochemical contents in Lamiaceae plants. **Food Chemistry**, v. 124, p. 833-841, 2011.

LIMA, A.J.P. **Extração, caracterização e confirmação das estruturas dos ácidos graxos majoritários presentes no óleo da Terminalia catappa linn (Castanhola) através de técnicas espectroscópicas**. João Pessoa: UFPB, 2016. 130f. Dissertação (Mestrado).

MARIUTTI, L. R. B.; NOGUEIRA, G. C.; BRAGAGNOLO, N. Lipid and cholesterol oxidation in chicken meat are inhibited by sage but not by garlic. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 6, p. C909-C915, 2011.

MEDEIROS S.R., GOMES R.C., BUNGENSTAB D.J. **Nutrição de bovinos de corte: Fundamentos e aplicações**. 1º ed., Brasília: Embrapa, 2015, 176 p.

OLIVEIRA, R.R. et al. Antioxidantes naturais em produtos cárneos. **PUBVET**, Londrina, V. 6, N. 10, Ed. 197, Art. 1324, 2012.

MEIRELES, B. R. L. A. **Potencial nutricional e antioxidante do fruto do catolé (Syagrus cearensis)**. Paraíba, João Pessoa: UFPB, 2017. 114. Tese (doutorado).

PEREIRA, MARLENE G. **Aplicação de antioxidantes naturais em carne mecanicamente separada (CMS) de aves**. Santa Maria: UFSM, 2009. 126. Dissertação (mestrado).

ROSMINI, M.R. et al. TBA test by extractive method applied to "Paté". **Meat Science**, v.42, p. 103-110, 1996.

ROSSI, J. A. J.; SINGLETON, V. L. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SANTOS, C.M. **Elaboração de linguiça frescal ovina com diferentes níveis de gordura**. Bagé: UNIPAMPA, 2016. 29 f. Monografia (Curso de Especialização em Processos Agroindustriais).

SERAFINI, L. F. **Atividade antioxidante dos extratos de manjerona e pólen apícola: efeitos na qualidade de hambúrguer**. Pato Branco: UTFP, 2013. 136 f. Dissertação (Mestrado).

SIGER, A.; CZUBINSKI, J.; KACHLICK, P.; DWIECKI, K.; LAMPART-SZCZAPA, E.; NOGALA-KALUCKA, M. Antioxidant activity and Phenolic content in three lupin species. **Journal of Food Composition and Analysis**. V. 25, n. 2, p. 190-197, 2012.

SILVA, F. A. P., ESTÉVEZ, M., FERREIRA, V. C. S., SILVA, S. A., LEMOS, L. T. M., IDA, E. I. Characterization of preserved meat from spent hen and broiler by salting and forced-air drying. **Journal of Food Processing and Preservation**, n. 41, p. 1-10, 2017.

SILVA, T. M. S.; CAMARA, C. A.; LINS, A. C. da S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, E. M. S.; FREITAS, B. M.; SANTOS, F. A. R. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Meliponasubnitida* Ducke. **Journal of Food Composition and analysis**, v. 19, p. 507-511, 2006.

UTRERA, M., ARMENTEROS, M., VENTANAS, S., SOLANO, F., & ESTÉVEZ, M. Prefreezing raw hams affects quality traits in cooked hams: Potential influence of protein oxidation. **Meat Science**, n.92, p.596-603, 2012.

VIEIRA, S. A., ZHANG, G., & DECKER, E. A. Biological implications of lipid oxidation products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, n. 94, p. 339-351, 2017.

## AVALIAÇÃO DO USO DE AÇÚCAR NA TERAPIA TÓPICA DE FERIDAS

### **Ingrid dos Santos Farias**

Bacharel em Medicina Veterinária, UFPI  
Teresina- Piauí

### **Emanuelle Karine Frota Batista**

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal,  
UFPI  
Teresina- Piauí

### **Hebelys Ibiapina da Trindade**

Instituto Federal do Maranhão  
São Raimundo das Mangabeiras- Maranhão

### **Janayna Batista Barbosa de Sousa Muller**

Secretaria Estadual da Saúde do Piauí,  
Teresina- Piauí

### **Maria José Lima Nascimento**

Clínica Veterinária Animal's  
Teresina- Piauí

### **Evanita da Rocha Luz**

Médica Veterinária autônoma,  
Teresina- Piauí

### **Maria do Carmo de Souza Batista**

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal,  
UFPI  
Teresina- Piauí

**RESUMO:** O açúcar é eficaz no tratamento de feridas e atua como antibiótico, interferindo com o equilíbrio osmótico da célula bacteriana. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do açúcar granulado, refinado e xarope na terapia tópica de feridas limpas e infectadas

por *Pseudomonas sp* e *Staphylococcus aureus*. Os experimentos foram divididos em duas fases, ambas utilizando camundongos. Nestes foram produzidas feridas na região dorso-lateral, após anestesia dissociativa. Na primeira fase, avaliou-se a macroscopia das feridas limpas e infectadas por *Pseudomonas sp*, tratadas com açúcar granulado, refinado e xarope de açúcar. Na fase dois, avaliou-se a macro e microscopia de feridas limpas e infectadas por *S. aureus*, tratadas com açúcar granulado. Realizou-se observação clínica diária e avaliação histopatológica do tecido cicatricial. Na primeira fase não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre o açúcar granulado e xarope, mas o açúcar reduziu o tempo de cicatrização de feridas infectadas ( $11,87\pm 1,55$  e  $12,87\pm 1,64$  dias, respectivamente) em comparação com as feridas infectadas não tratadas ( $15,25\pm 1,75$  dias). Na fase dois, apenas o grupo infectado e não tratado apresentou diferença estatística. Concluiu-se que o açúcar reduz significativamente o tempo de cicatrização de feridas infectadas promovendo a formação de um tecido de granulação mais organizado.

**PALAVRAS-CHAVE:** cicatrização, ferimentos, *Pseudomonas sp*, *Staphylococcus aureus*

## EVALUATION OF SUGAR USE IN TOPICAL WOUND THERAPY

**ABSTRACT:** Sugar is effective in treating wounds and acts as an antibiotic, interfering with the osmotic balance of the bacterial cell. The objective of this work was to evaluate the effect of granulated, refined and syrup sugar on topical treatment of clean and infected wounds by *Pseudomonas sp* and *Staphylococcus aureus*. The experiments were divided into two phases, both using mice. In these cases wounds were produced in the dorsolateral region, after dissociative anesthesia. In the first phase, the macroscopy of the clean and infected wounds of *Pseudomonas sp* treated with granulated sugar, refined and sugar syrup was evaluated. In phase two, the macro and microscopy of clean and *S. aureus*-infected wounds treated with granulated sugar were evaluated. Daily clinical observation and histopathological assessment of scar tissue were performed. In the first phase there was no significant difference ( $P > 0.05$ ) between granulated sugar and syrup, but sugar reduced the healing time of infected wounds ( $11,87 \pm 1,55$  and  $12,87 \pm 1,64$  days, respectively) compared to untreated infected wounds ( $15,25 \pm 1,75$  days). In phase two, only the infected and untreated group presented statistical difference. It was concluded that sugar significantly reduces the healing time of infected wounds by promoting the formation of a more organized granulation tissue.

**KEYWORDS:** healing, wounds, *Pseudomonas sp*, *Staphylococcus aureus*

## INTRODUÇÃO

Ferida é toda e qualquer ruptura da continuidade normal da pele, geralmente produzida por ação traumática externa a partir de dano físico, químico, térmico (MELO et al., 2009; THAKUR et al., 2011). A cicatrização é o processo pelo qual um tecido lesado é substituído por tecido conjuntivo vascularizado, quer a lesão tenha sido traumática ou necrótica (PANOBIANCO et al., 2012). Assim, o processo de cicatrização tem como finalidade restabelecer a homeostasia tecidual (CAVALCANTE et al., 2012).

A cicatrização pode ocorrer por primeira, segunda ou terceira intenção. Na cicatrização por primeira intenção, a ferida é considerada limpa, com perda mínima de tecido e possibilidade de aproximação das bordas da lesão por suturas. O fechamento por segunda intenção está relacionado a ferimentos potencialmente infectados e/ou com significativa perda tecidual, inviabilizando a aproximação das bordas via sutura. Esse processo requer maior produção de tecido de granulação e tempo mais prolongado para a contração e epitelização da ferida (BLANCK, 2008). Na cicatrização por terceira intenção a ferida é deixada aberta por um período, funcionando como cicatrização por segunda intenção, sendo suturada posteriormente, como cicatrização por primeira intenção. Este procedimento é empregado geralmente nas feridas cirúrgicas com infecção (BLANES, 2004).

Se as feridas não forem tratadas corretamente, a infecção pode ocorrer e o processo de cicatrização e a reepitelização ocorre de forma mais lenta

(INNGJERDINGER et al., 2004). O tratamento de feridas infectadas é importante na prática clínico-cirúrgica, especialmente no momento atual de aparecimento crescente de microrganismos resistentes, decorrente do uso indiscriminado de antimicrobianos (ALVES et al., 2008). Alguns medicamentos com efeito cicatrizante podem ser utilizados para favorecer e acelerar a reparação tecidual. Atualmente, há uma grande tendência para o aproveitamento de produtos naturais a base de extratos de plantas, (fitoterápicos), o mel e o açúcar como opções eficientes para o tratamento de todos os tipos de feridas, por apresentarem vantagens econômicas, serem eficientes e apresentarem poucos efeitos colaterais. Esta categoria de medicamentos promove a cicatrização por diversos mecanismos, além da ação anti-inflamatória e antibiótica (THAKUR et al., 2011; SANTOS et al., 2012).

O açúcar é indicado para a fase inflamatória da cicatrização até início da fase proliferativa. Sua ação na terapêutica de feridas inclui: redução do edema local, pois é capaz de atrair fluidos e linfa para a ferida; taxia de macrófagos que aceleram a descamação do tecido necrótico, permitindo um debridamento superficial; fornecimento de energia para as células e formação de camada protetora de proteína sobre a lesão; redução na congestão vascular dos tecidos perilesionais, melhorando sua oxigenação e irrigação; maturação do tecido de granulação (KRAHWINKEL; BOOTHE, 2006; O'CONNELL; WARDLAW, 2011). A alta osmolaridade também promove ação antibacteriana, principalmente contra *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus canis* (O'CONNELL; WARDLAW, 2011).

Embora existam vários estudos que mostram a eficácia do uso do açúcar em feridas, ainda não se sabe se o açúcar possui atividade cicatrizante, ou se a cicatrização se deve à sua atividade antimicrobiana. Estudos sobre a investigação histológica das feridas tratadas com açúcar são raros. Portanto, este estudo foi realizado objetivando avaliar o efeito do açúcar nas formulações de granulado, refinado e xarope na terapia tópica de feridas limpas e infectadas por *Pseudomonas* sp, e avaliar o processo de cicatrização macroscópica e microscópica de feridas limpas e infectadas com *Staphylococcus aureus*, tratados com a formulação de açúcar granulado.

## MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí (UFPI), protocolo n<sup>o</sup> 002/12. Esse experimento foi realizado em duas etapas no Laboratório de Ciências Fisiológicas, do Departamento de Morfofisiologia Veterinária do Centro de Ciências Agrárias – UFPI.

### Primeira etapa

#### *Animais*

Nesta etapa foram utilizados 64 camundongos (*Mus musculus*) de ambos os sexos,

fornecidos pelo Biotério de Manutenção de Animais Destinados à Experimentação (BIOMADEx) do Centro de Ciências Agrárias – UFPI. Estes animais foram divididos em oito grupos, com oito animais cada. Todos os camundongos foram mantidos em condições uniformes de manejo, recebendo ração balanceada e água *ad libitum*.

### *Estirpes bacterianas*

As estirpes bacterianas foram obtidas de culturas de *Pseudomonas aeruginosa*, cultivadas em caldo de lactose e mantidas no Laboratório Microbiologia da Universidade Federal do Piauí.

### *Confeção cirúrgica das feridas*

As feridas foram confeccionadas pelo método cirúrgico, mediante prévia anestesia dissociativa (associação de xilazina 8,0 mg/kg e cloridrato de cetamina 140 mg/kg, via intraperitoneal). Após a anestesia dos animais, selecionou-se a região lateral direita da linha média dorsal realizando-se tricotomia e antissepsia (solução de álcool iodado a 2%). As feridas foram demarcadas usando-se um molde de esparadrapo com 1cm<sup>2</sup> e produzidas cirurgicamente, retirando-se a pele e tecido subcutâneo.

Nos grupos GII, GIV, GVI e GVIII, a infecção das feridas foi realizada imediatamente após a cirurgia, realizando-se três aplicações subsequentes a cada seis horas, obtidas da cultura de *P. aeruginosa* com o auxílio de zaragatoas esterilizadas. Quarenta e oito horas após a confecção cirúrgica das feridas coletou-se material das mesmas, que foi semeada em um tubo de ensaio contendo ágar-lactose e Gram (ALVES et al., 2008).

### *Tratamentos*

Após 72 horas da confecção das feridas, confirmou-se a presença de microrganismos em todas as lâminas provenientes dos grupos GII, GIV, GVI e GVIII, e procedeu-se o tratamento tópico das feridas conforme tabela 1.

<b>Grupos</b>	<b>Tipos de feridas</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Esquema de Administração</b>
GI	Limpa	Controle	Não tratada
GII	Infectada	Controle	Não tratada
GIII	Limpa	Açúcar granulado	2 vezes por dia
GIV	Infectada	Açúcar granulado	2 vezes por dia
GV	Limpa	Açúcar refinado	2 vezes por dia
GVI	Infectada	Açúcar refinado	2 vezes por dia
GVII	Limpa	Xarope de açúcar	2 vezes por dia
GVIII	Infectada	Xarope de açúcar	2 vezes por dia

Tabela 1 - Delineamento experimental da primeira etapa do experimento

O xarope foi uma solução de água destilada com açúcar a 85%, fervida durante três minutos e mantida à temperatura ambiente. Antes de cada aplicação tópica, as feridas foram limpas com um cotonete levemente umedecido com água filtrada. Nos grupos GVII e GVIII, swabs foram usadas para auxiliar as aplicações de xarope.

### *Avaliação macroscópica do processo de cicatrização*

A avaliação macroscópica das feridas foi feita por observação diária de sua aparência, verificando a ocorrência de hiperemia, exsudação e a presença da crosta. No sétimo e décimo dia após a cirurgia, a área da lesão de cada ferida foi medida com auxílio de um paquímetro.

## **Segunda etapa**

### *Animais*

Na segunda fase, 56 camundongos de ambos os sexos foram divididos em oito grupos de sete animais, que foram mantidos em condições idênticas às da primeira fase. Cada grupo consistiu em quatro machos e três fêmeas. As feridas foram produzidas de maneira semelhante à primeira etapa.

### *A infecção das feridas*

Nos grupos GIV, GVI e GVIII, a infecção das feridas foi feita por aplicação da cultura de *Staphylococcus aureus* (estirpe MRPI98) com o auxílio de zaragatoas estéreis, imediatamente depois da cirurgia. Para confirmar a infecção, o material colhido a partir das feridas foi semeado em caldo de lactose e Gram, e foram preparadas lâminas, 48 horas após a infecção.

### *Tratamento*

Nesta etapa apenas o açúcar granulado foi utilizado na terapêutica tópica das feridas. A aplicação do tratamento começou 50 horas após a confecção das feridas, conforme delineamento abaixo (Tab. 2).

Grupos	Tipos de feridas	Tratamento	Esquema de Administração
GI	Limpa	Controle	Não tratada
GII	Infectada	Controle	Não tratada
GIII	Limpa	Açúcar granulado	1 vezes por dia
GIV	Infectada	Açúcar granulado	1 vezes por dia
GV	Limpa	Açúcar granulado	2 vezes por dia
GVI	Infectada	Açúcar granulado	2 vezes por dia
GVII	Limpa	Açúcar granulado	3 vezes por dia
GVIII	Infectada	Açúcar granulado	3 vezes por dia

Tabela 2 - Delineamento experimental da segunda etapa do experimento

### *Avaliações macroscópicas e microscópicas*

A avaliação macroscópica das feridas foi feita de forma idêntica à da primeira fase. Para a avaliação microscópica da morfologia do tecido, dois animais selecionados aleatoriamente de cada grupo, sendo um macho e uma fêmea, foram eutanasiados por sobredose anestésica e fragmentos das feridas foram coletados, nos dias sete e dez após a cirurgia. Estes fragmentos foram fixados em formal a 10% durante 24 horas, desidratados em álcool, diafanizados em xilol, embebidos em parafina, cortadas em 5µm e coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (LUNA, 1968).

### **Análise estatística**

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ambos a 5% de probabilidade.

## **RESULTADOS**

Na primeira fase do experimento, o estudo macroscópico revelou diferenças significativas entre o GII (feridas não tratadas e não infectadas) e todos os outros grupos, sendo que estes não diferem entre si, em relação ao tempo de cicatrização, como apresentado na Tabela 3.

Grupos	Tipos de feridas	Esquema de Administração	Tempo de cicatrização (dias)	Desvio padrão
GI	Limpo	Não tratada	12,63a	1,41
GII	Infectado	Não tratada	15,25b	1,75
GIII	Limpos	2 vezes por dia	12,75a	1,83
GIV	Infectada	2 vezes por dia	11,87a	1,55
GV	Limpos	2 vezes por dia	12,25a	1,91
GVI	Infectada	2 vezes por dia	12,87a	1,64
GVII	Limpo	2 vezes por dia	11,25a	1,53
GVIII	Infectada	2 vezes por dia	11,62a	1,92

Tabela 3 - Tempo de tratamento de feridas limpas e infectadas por *Pseudomonas sp*, tratadas topicamente com açúcar em formulações diferentes, aplicado duas vezes por dia

Nota: diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa (P <0,05).

Não houve diferença significativa entre as formulações analisadas, embora o tempo médio de cicatrização nos grupos tratados com xarope de açúcar foi menor. Provavelmente devido a este fornecer um maior contato do açúcar com o ferimento. Verificou-se que o açúcar foi eficaz na redução do tempo de cicatrização de feridas infectadas por *Pseudomonas* sp.

Não foi observada mortalidade dos animais durante o experimento, indicando que o murino é muito resistente, pois a *P. aeruginosa* causa infecções graves com alta letalidade (PELLEGRINO et al., 2012), sendo uma das principais bactérias causadoras de infecção, superada apenas pelo *Staphylococcus* coagulase-negativo e *Staphylococcus aureus* (SADER et al., 2001). Além disso, os animais foram submetidos à tensão produzida por cirurgia, além de sofrer uma perda de pele relativamente grande.

Na segunda fase do experimento, verificou-se que o açúcar granulado não causa redução acentuada no tempo de cicatrização de feridas limpas, mas em feridas infectadas com *S. aureus* e tratadas com açúcar granulado, o processo de cicatrização foi rápido quando comparada com os ferimentos não tratados (Tabela 4). O esquema de administração não apresentou diferença estatisticamente significativa sobre o tempo de cicatrização.

Grupos	Tipos de feridas	Esquema de Administração	Tempo de cicatrização (dias)	Desvio padrão
GI	Limpo	Não tratada	10,29a	1,25
GII	Infectado	Não tratada	16,43b	2,37
GIII	Limpos	2 vezes por dia	12,14a	1,06
GIV	Infectada	2 vezes por dia	13,71a	3,19
GV	Limpos	2 vezes por dia	11,14a	2,41
GVI	Infectada	2 vezes por dia	13,43a	1,98
GVII	Limpo	2 vezes por dia	11,86a	2,03
GVIII	Infectada	2 vezes por dia	12,86a	2,54

Tabela 4 - Tempo médio de cicatrização de feridas limpas e infectadas pelo *S. aureus*, tratadas topicamente com açúcar em diferentes esquemas de administração

Nota: diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa (P<0,05).

Avaliação histológica do processo cicatricial indica que os grupos tratados apresentaram um tecido de granulação mais evidente que os grupos não tratados, com vários fibroblastos e fibras de colágeno paralelas à superfície, cuja organização foi mais evidente quando os tratamentos foram aplicados dois e três vezes por dia.

## DISCUSSÃO

O açúcar tem um efeito bactericida *in vitro* contra *Pseudomonas* sp. (MARTINEZ; SGARBI; SGARBI, 1986), bem como um efeito bactericida *in vivo* sobre a cicatrização de úlceras de pressão infectadas por *Pseudomonas* sp. (ALVES; DEANA, 2009). O

açúcar também é eficaz no tratamento de infecções causadas por *S. aureus* (ADDISON; WALTERSPIEL, 1985). Esta bactéria é frequentemente encontradas em feridas cutâneas infectadas, sendo resistente à baixa atividade da água (MORRIS, 2008). Por outro lado, a *P. aeruginosa* é um patógeno oportunista, ou seja, que raramente causa doenças em um sistema imunológico saudável, mas explora eventuais fraquezas do organismo para estabelecer um quadro de infecção. É a causa mais comum de infecções no ouvido e por queimaduras, e é o mais frequente colonizador de equipamentos médicos (HENRIQUES, 2004).

A atividade do açúcar contra a infecção por *Pseudomonas* sp. deve envolver uma hiperosmolaridade inerente (BALL et al., 2010), com menor disponibilidade de água na lesão, reduzindo-a para níveis que limitam o crescimento de microrganismos (PELLEGRINO et al., 2002). O açúcar atrai macrófagos, que participam na “limpeza” da ferida, aceleram o descolamento do tecido desvitalizado, necrótico e/ou gangrenoso, proporciona uma fonte de energia local e forma uma camada protetora de proteína para a ferida. Tem também propriedades desodorizantes, uma vez que as bactérias utilizam a glicose em vez do metabolismo de aminoácidos, a produção de ácido láctico em vez de substâncias maloliente (amoníaco, aminas e aminoácidos contendo enxofre). O açúcar não só absorve o líquido a partir do citoplasma das bactérias, mas também a partir das células da superfície do leito da ferida. Estas células, ao contrário das bactérias, estão ligadas umas as outras, e o processo de hidratação não ocorre, mas uma migração de fluidos e sangue a partir dos substratos de superfície da ferida, com a formação de microcapilares, fazendo com que a ferida fique mais nutrida e úmida, o que ajuda seu debridamento, evitar odores desagradáveis durante a eliminação de detritos e substrato bacterianos, promovendo uma cicatrização mais fisiológica, rápida, limpa e consolidada (MERCHAN-MAYADO; FERRY; MELERO-RUBIO, 2006).

As ações obtidas com o emprego do açúcar em feridas contaminadas ou infectadas são: oferta de nutrição às células lesadas, diminuição do odor exalado pela inibição do crescimento bacteriano, drenagem da exsudação pela ação osmótica, redução do edema inflamatório devido ao seu efeito higroscópico, diminuição do pH, o que eleva o efeito bacteriostático, dilatação dos pequenos vasos sanguíneos, aprimorando a nutrição tecidual, formação de uma camada protetora de proteína, liberação de calor ao dissolver-se, atração de macrófagos reduzindo a necessidade de debridamento cirúrgico e estimulação do tecido de granulação, em parte pela ação mecânica local de eliminação de tecido necrótico e estimulação do crescimento de tecido epitelial (SERAFINI et al., 2012).

## CONCLUSÃO

Devido às suas propriedades antimicrobianas, o açúcar reduz o tempo de cicatrização de feridas infectadas, e nas feridas limpas seu poder de cicatrização não

é um resultado do processo de aceleração cicatricial, mas a partir da formação de uma matriz extracelular mais organizada.

## REFERÊNCIAS

ADDISON, M. K.; WALTERSPIEL, J. N. Sugar and wound healing. *Lancet*, vol. 326, n. 8456, p. 663–664, 1985.

ALVES N, DEANA NF. O açúcar refinado no tratamento da infecção por *Pseudomonas* sp em úlcera por pressão. *Revista Enfermagem UERJ*. Vol. 17, n. 2, p. 194-197, 2009.

ALVES, D. F. S.; CABRAL JÚNIOR, F. C.; CABRAL, P. P. A. C.; OLIVEIRA JUNIOR, R. M.; REGO, A. C. M.; MEDEIROS, A. C. Efeitos da Aplicação Tópica do Mel de *Melipona Subnitida*. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*. Vol. 35, p. 188-193, 2008.

BALL, C. G.; RAJANI, R. R.; SALOMONE, J. P.; VERCRUYSSSE, G. A. The utility of sugar for complicated wounds: an old solution worth revisiting. *Surgical Infections*. Vol. 11, n. 2, p. 187-188, 2010.

BLANCK, M. *Fisiopatologia das feridas*. 2008. Disponível em: <[http://pt.scribd.com/audrey\\_muniz/d/65437899-14](http://pt.scribd.com/audrey_muniz/d/65437899-14)>. Acesso em: 15 jun. 2015.

BLANES, L. *Tratamento de feridas*. 2004. Disponível em: <<http://bapbaptista.com.br/feridasLeila.pdf>>. Acesso em: 14 jun. 2015.

CAVALCANTE, L. C.; MOREIRA, M. C.; MOTA, O. M. L.; TURATTI, E.; VIANA, F. A. C.; PEREIRA, S. L. S. Efeito da pedra umes no processo de cicatrização tecidual. Estudo histológico em dorso de ratos. *Brazilian Journal Periodontology*. Vol. 22, n. 1, p. 69-73, 2012.

HENRIQUES, A. *Mel: Um milagre da natureza para o tratamento de feridas*. School of Applied Sciences; University of Wales Institute; Wales, Cardiff, UK. 2004. Disponível em: <<http://www.Formatte.com/Mediateca>>. Acesso em: 09 jun. 2011.

INNGJERDINGER, K.; NERGARD, C. S.; DIALLO, D.; MOUNKORO, P. P.; PAULSEN, B. S. An ethnopharmacological survey of plants used for wound healing in Dongoland, Mali, West Africa. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 92, p. 233-244, 2004.

KRAHWINKEL, D. J.; BOOTHE, H. W. Topical and systemic medications for wounds. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. Vol. 36, n. 4, p. 739-757, 2006.

LUNA, L. G. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3th edn. New York: McGraw-Hills Book; 1968.

MARTINEZ, N. R.; SGARBI, E. C.; SGARBI, S. T. O açúcar no tratamento das feridas infectadas. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*. Vol. 76, n. 1, p. 23-26, 1986.

MELO, U. P.; FERREIRA, C.; PALHARES, M. S.; SILVA FILHO, J. M. Fisiopatologia da cicatrização das feridas nos equinos. *Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária*. Vol. 15, n. 48, p. 32-42, 2009.

MERCHAN-MAYADO, E.; FERRY, O. C.; MELERO-RUBIO, E. Cura de heridas infectadas post-implantación de catéter peritoneal mediante tratamiento tópico con azúcar y Vitamina C. *Revista de la Sociedad Española de Enfermería Nefrológica*. Vol. 9, n. 1, p. 65-68, 2006.

MORRIS, C. The use of honey in wound care and the Mesitran product range. *Wounds UK*. Vol. 4, n. 3, p. 84-87, 2008.

O'CONNELL, K.; WARDLAW, J. L. Unique Therapies for Difficult Wounds. *Today's Veterinary Practice*, [s.i.], p.1-7, 2011.

PANOBIANCO, M. S.; SAMPAIO, B. A. L.; CAETANO, E. A.; INOCENTI, A.; GOZZO, O. Comparação da cicatrização pós-mastectomia entre mulheres portadoras e não-portadoras de diabetes mellitus. *Revista Rene*. Vol. 11, p. 15-22, 2012.

PELLEGRINO, F. L.; TEIXEIRA, L. M.; CARVALHO, M. M. G.; NOUER, A. S.; SAMPAIO, J. L. M.; FREITAS, A. D. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 40, p. 2420-2424, 2002.

SADER, H. S.; GALES, A. C.; PFALLER, M. A.; MENDES, R. F.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. vol. 5, n. 4, p. 200-214, 2001.

SANTOS, I. F. C.; GROSSO, S. L. S.; BAMBO, O. B.; NHAMBIRRE, A. P.; CARDOSO, J. M. M.; SCHMIDT, E. M. S. Mel e açúcar mascavo na cicatrização de feridas. *Ciência Rural*. Vol. 42, n. 12, p. 2219-2224, 2012.

SERAFINI, G. M. C.; SCHOSSLER, J. E. W.; AMARAL, A. S.; DUTRA, L. H.; DIBI, A. P.; DROGEMOLLER, P. Açúcar granulado ou gel no tratamento de feridas em cães. *Ciência Rural*. Vol. 42, n. 12, p. 2213-2218, 2012.

THAKUR, R.; JAIN, N.; PATHAK, R.; SANDHU, S. S. Practices in Wound Healing Studies of Plants. *Evidence-based Complementary And Alternative Medicine*. [s.i.], p. 1-17, 2011.

## AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA VITAMINA C SOBRE A DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA NA FASE AGUDA DA DOENÇA DE CHAGAS EM CAMUNDONGOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM A CEPA QM2 DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

### **Patrícia Milani de Moraes**

Faculdade de Medicina de Marília  
Marília/SP

### **Bruna de Lima Pereira**

Faculdade de Medicina de Marília  
Marília/SP

### **Ludmyla Toller Cocco**

Faculdade de Medicina de Marília  
Marília/SP

### **Luciamare Perinetti Alves Martins**

Departamento de Parasitologia da Faculdade de  
Medicina de Marília  
Marília/SP

**RESUMO:** O presente estudo testou o papel da vitamina C na doença de Chagas através de estudo bioquímico da G6PD e FRAP. Para tanto, foram determinados os perfis antioxidantes de animais infectados e não infectados e suplementados ou não com vitamina C, no 15°, 30° e 60° dia pós-infecção, separados aleatoriamente em quatro grupos (A, B, C e D) de 12 camundongos “Swiss”. Os resultados obtidos indicaram: a) G6PD: No tecido muscular esquelético e no fígado, separadamente, houve  $p < 0,05$  entre grupo A e D durante os 30 dias pós-infecção e entre os animais do grupo D entre 15 e 30 dias. No músculo houve  $p < 0,05$  entre os grupos B e D no 30° dia, além de apresentar os menores valores enzimáticos

quando comparado aos demais tecidos no 30° e 60° dias. No fígado, houve os maiores valores de atividade enzimática durante o 30° e 60° dia. Os três tecidos apresentaram  $p < 0,05$  entre os animais do grupo A entre 15 e 60 dias e também no grupo B entre 15 e 30 dias. b) FRAP: No 15° dia pós-infecção, a atividade antioxidante foi maior nos animais infectados, o que também ocorreu no 30° dia. Nos três tecidos do grupo A houve aumento da capacidade antioxidante ao longo dos 30 dias. No músculo do grupo D, houve diminuição da capacidade antioxidante nos 30 dias. No grupo B entre 15 e 60 dias houve aumento da capacidade antioxidante total do coração e fígado. Entretanto, no grupo C, entre 15 e 30 dias, ocorreu uma diminuição na capacidade antioxidante total do tecido hepático. Concluímos então: a) G6PD: Em alguns momentos, a vitamina C atuou com efeito pró-oxidativo, sendo, portanto, prejudicial ao tratamento da doença de Chagas, em outra associação, não foi possível especificar se foi a vitamina C ou a própria infecção que aumentou o dano celular. Pode-se questionar a possibilidade de a vitamina C, nos três tecidos, ter um efeito pró-oxidativo no início da infecção/tratamento, já que com 30 dias há um aumento significativo do estresse oxidativo, enquanto que com a infecção ocorreu com aproximadamente 60 dias pós-infecção. b) FRAP: A suplementação com vitamina C pode

ter sido maléfico, considerando um efeito pró oxidante da substância.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Trypanosoma cruzi*. defesas antioxidantes. glicose-6-fosfato desidrogenase. FRAP. estresse oxidativo.

**ABSTRACT:** This study sought to clarify the true role of vitamin C in Chagas disease through an enzymatic study of G6PD and FRAP. The antioxidant profiles of 12 infected and uninfected and vitamin C-supplemented animal and not supplemented were randomly assigned to four groups (A, B, C and D) of 12 Swiss mice. The results indicated: a) G6PD: In skeletal muscle tissue and liver, there were  $p < 0.05$  between group A and D during the 30 days postinfection and between the animals of group D between 15 and 30 days. In the muscle there were  $p < 0.05$  between groups B and D on the 30th day, in addition to presenting the lowest enzymatic values when compared to the other tissues in the 30th and 60th days. In the liver, there were the highest values of enzymatic activity during the 30th and 60th day. The three tissues presented  $p < 0.05$  between the animals of group A between 15 and 60 days and also in group B between 15 and 30 days. b) FRAP: On the 15th day post-infection, the antioxidant activity was higher in the infected animals, which also occurred on the 30th day. In the three tissues of group A there was an increase in antioxidant capacity over the 30 days. In the muscle of group D, there was a reduction of the antioxidant capacity in the 30 days. In group B between 15 and 60 days there was an increase in the total antioxidant capacity of the heart and liver. However, in group C, between 15 and 30 days, there was a decrease in the total antioxidant capacity of the hepatic tissue. We conclude a) G6PD: At some moments, vitamin C acted with pro-oxidative effect, and, therefore, harmful to the treatment of Chagas disease, in another association, it was not possible to specify if it was the vitamin C or the infection itself that increased the damage cell. One may question the possibility that vitamin C in the three tissues has a more recent pro-oxidative effect, since at 30 days there is a significant increase of oxidative stress, while the infection reaches it with approximately 60 days post infection. b) FRAP: Vitamin C supplementation proved to be harmful to the treatment of Chagas due to the increase in antioxidant activity.

**KEYWORDS:** *Trypanosoma cruzi*. antioxidant defenses. glucose-6-phosphate dehydrogenase. FRAP. oxidative stress.

## 1 | INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário parasita transmitido por insetos hematófagos da família Triatominae, popularmente conhecidos como “barbeiros”. Em humanos a infecção apresenta uma fase aguda com elevada parasitemia e formação de ninhos amastigotas e a fase crônica com lesão dos plexos nervosos cardíaco, mioentérico e esofágico através de ação imune e do protozoário, levando às apresentações clínicas da doença.

Do ponto de vista imunológico, foi demonstrado que a ativação de macrófagos

pelo *T. cruzi* resulta na formação de espécies reativas do oxigênio (EROs) (GUPTA et al., 2009), que podem causar danos em qualquer tecido, porém a membrana celular é um dos mais lesados devido à peroxidação lipídica (MELLO FILHO, 1984) e, para combater os radicais livres, os sistemas biológicos aeróbicos utilizam a defesa antioxidante, pois possuem mecanismos de defesa enzimáticos e não enzimáticos (VALAVANIDIS et al., 2006) que protegem os componentes celulares contra danos causados por oxidação, inibindo ou diminuindo a oxidação resultante das espécies reativas de oxigênio (MCCORD, 2000).

O uso da terapia antioxidante como um meio de aumentar a defesa antioxidante do hospedeiro na doença de Chagas e minimizar os danos oriundos do estresse oxidativo, tem sido estudado, por Maçao et al. (2007) que encontraram resultados favoráveis ao hospedeiro com o uso da vitamina C em associação a vitamina E, contudo os resultados obtidos por Marim et al. (2015) não deixam claro se o uso isolado de ácido ascórbico agiu como anti ou pró-oxidante quando administrado por longo período na infecção chagásica experimental. A vitamina C, um antioxidante não enzimático, atua como agente redutor de diferentes reações, mas sua propriedade mais difundida é a de ser um dos mais poderosos antioxidantes do plasma. Embora as propriedades antioxidantes da vitamina C estejam bem estabelecidas (FREI, ENGLAND E AMES, 1989; BARREIROS *et al*, 2006), ainda é discutível o seu possível efeito pró oxidante (DUARTE & LUNEC, 2005) e anti/pro-inflamatório (JIALAL & SINGH, 2006; MIKIROVA *et al.*, 2012).

Após a penetração das formas tripomastigotas e sua internalização nas células de defesa do hospedeiro iniciam-se o desenvolvimento do estresse oxidativo causado pelo *burst* respiratório. Assim, observa-se que a Glicose 6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH), que é a primeira e a enzima limitante do ramo oxidativo da via das pentoses fosfato, é uma via alternativa e independente da glicólise, gerando NADPH e pentoses (ribose-5-fosfato). Assim, a atividade da enzima G6PDH aumenta quanto maior a necessidade de NADPH para manter a GSH, com o objetivo de proteger as células da lesão oxidativa em condições normais.

Desta forma, o hospedeiro responde à fase aguda da infecção por mecanismos de “up regulation” do sistema de defesa antioxidante envolvendo a Glutathione. (WEN & GARG, 2004) e, sendo a coenzima Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzida (NADPH) a principal fornecedora de elétrons redutores no citoplasma, seu papel torna-se essencial para manter a Glutathione em seu estado reduzido (CHAN et al., 1999). A GSH exerce um papel central na manutenção do estado redox e suas funções protegem as células contra danos oxidativos. Paralelamente, existe formação de substâncias antioxidantes não enzimáticas como ácido úrico (SAMUDI et al., 2009).

Neste cenário, a avaliação da atividade destas enzimas, bem como os antioxidantes não enzimáticos no modelo experimental de suplementação da vitamina C na doença de Chagas poderá oferecer importantes indicações sobre os efeitos da suplementação nestas defesas do sistema antioxidante.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho foram utilizados 32 camundongos “Swiss” machos de 20 dias de idade, os quais foram infectados pela via intraperitoneal com  $5,0 \times 10^4$  formas tripomastigotas da cepa QM2 de *T. cruzi* (Martins et al., 2008), com sangue proveniente de outro camundongo previamente infectado. Após a infecção, foram separados aleatoriamente quatro grupos de 12 camundongos cada os quais foram denominados grupos A, B, C e D.

Grupo A: animais não-infectados e alimentados com ração padrão e água sem vitamina C.

Grupo B: animais não-infectados e alimentados com ração padrão e água suplementada com o equivalente a 500 mg/dia de vitamina C.

Grupo C: animais infectados e alimentados com ração padrão e água sem vitamina C.

Grupo D: animais infectados e alimentados com ração padrão e água suplementada com o equivalente a 500 mg/dia de vitamina C.

Esses animais foram mantidos em gaiolas individuais no Biotério de Manutenção do Laboratório de Parasitologia onde receberam água, ração padrão (Nuvilab®) e água (suplementada ou não com vitamina C) *ad libitum*.

O tratamento iniciou no dia da infecção e os grupos receberam esse tratamento por 60 dias.

A dosagem equivalente a 500 mg/dia de vitamina C para adultos humanos foi determinada considerando pesquisas prévias realizadas (MARIN *et al.*, 2015). Para a suplementação da água que foi oferecida aos camundongos foi usado Cewin® gotas.

O bebedouro, que serviu de recipiente para a água suplementada, foi envolvido em papel alumínio para evitar a oxidação da vitamina C pela luz e a água foi trocada a cada 12 horas.

Para as análises bioquímicas, quatro animais de cada grupo foram eutanasiados com CO<sub>2</sub> no 30º e no 60º dia. Após a eutanásia dos animais, um fragmento do músculo esquelético, cardíaco e o fígado foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenados à -80°C.

Para a determinação de proteínas os tecidos foram homogeneizados em tampão de homogeneização (Tris 30 mM, EDTA 1 mM, MgSO<sub>4</sub> 5mM, pH 7,6) para a determinação do G6PDH e em solução gelada de KCl 1,15% (10% peso / volume) para a determinação do FRAP (LOWRY, 1951).

**FRAP:** A determinação da capacidade antioxidante total dos tecidos se baseou na capacidade dos antioxidantes não enzimáticos presentes na amostra em reduzir os íons Fe<sup>3+</sup> em Fe<sup>2+</sup> na presença de 2,4,6-tripiridyl-s-triazine (TPTZ) com a formação do complexo TPTZ-Fe<sup>2+</sup>, que possui intensa coloração azul medida em 593 nm (BENZIE & STRAIN, 1996).

**G6PDH:** A atividade da G6PDH foi determinada através da redução do NADP<sup>+</sup> por

meio de ensaio cinético em Tampão de ensaio (Tris 30 mM, EDTA 1 mM, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 5 mM, pH 7,6), segundo o protocolo de KORNBERG & HORECKER, 1955; LÖHR & WALLER, 1974.

Devido à natureza das variáveis em estudo, no resumo dos dados foram utilizadas médias, desvio-padrões. Os resultados foram analisados pelo teste de normalidade (Shapiro-Wilks) para verificar se os dados seguem uma distribuição normal e homogeneidade de variâncias entre os grupos pelo teste de Levene. As comparações entre os grupos foram realizadas por meio da análise de variância um fator. Quando o resultado do teste de normalidade dos dados foi significativo, por restrição teórica, foi utilizado o teste de análise de variância não-paramétrica de Kruskal-Wallis (ARMITAGE & BERRY, 1997). Foi adotado o nível de significância de 5% de probabilidade para a rejeição da hipótese de nulidade em todos os testes.

A forma de tratamento, cuidados e eutanásia dos camundongos seguiram as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CEUA). Este projeto foi aprovado pelo CEUA-Famema sob nº 1253/13.

### 3 | RESULTADOS

As Tabelas 1 e 2 demonstram os resultados obtidos no ensaio G6PD e FRAP respectivamente, assim como as Figuras de 1 a 6. Os valores estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) obtidos entre as associações de grupos foram identificados.

Os resultados mostraram que a atuação da enzima G6PD no tecido muscular esquelético e no fígado, separadamente, apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), entre o grupo A quando comparado ao grupo D durante os 30 dias pós-infecção e, no grupo D entre os 15° e 30° dias. Por outro lado, os três tecidos, separadamente, apresentaram ( $p < 0,05$ ) nos animais do grupo A entre os 15° e 60° dias e também no grupo B entre os 15° e 30° dias pós-infecção.

No músculo, houve ( $p < 0,05$ ) entre o grupo B com o grupo D no 30° dia pós-infecção, além disso, neste tecido, foram encontrados os menores valores de atividade enzimática quando comparado aos demais tecidos no 30° e 60° dias pós-infecção. Já no fígado, foram encontrados os maiores valores de atividade enzimática durante o 30° e 60° dia pós-infecção.

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
		15 dias		
Músculo	0,131 (0,055)	0,055 (0,004)	0,173 (0,184)	0,172 (0,076)
Coração	0,241 (0,097)	0,195 (0,082)	0,223 (0,029)	0,138 (0,052)
Fígado	0,223 (0,054)	0,078 (0,036)	0,365 (0,041)	0,218 (0,083)

30 dias				
Músculo	11,558 (3,166)	9,756 (0,429)	21,959 (12,868)	104,141 (36,212)
Coração	23,476 (4,221)	35,88 (7,064)	31,075 (4,826)	35,003 (6,992)
Fígado	27,177 (17,358)	41,097 (8,162)	33,716 (7,555)	70,844 (23,935)
60 dias				
Músculo	20,693 (9,173)	21,646 (32,167)	36,842 (15,781)	30,519 (20,342)
Coração	25,967 (7,176)	24,165 (8,922)	34,555 (12,443)	41,122 (16,652)
Fígado	27,067 (8,652)	27,827 (14,536)	48,567 (19,791)	45,88 (10,415)

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão para a atividade tecidual da enzima G6PD ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  proteína;  $37^\circ\text{C}$ , pH 7,6)

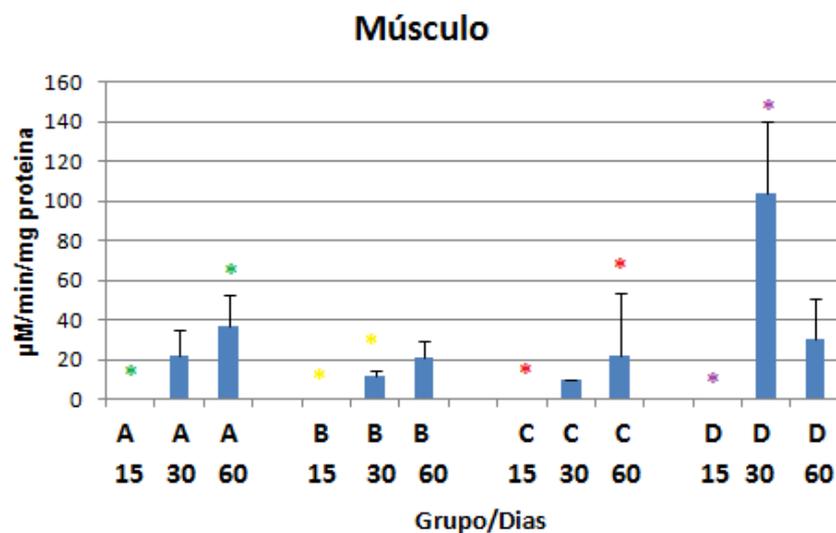


Figura 1. Valores médios e desvio padrão para atividade enzimática da G6PD no músculo esquelético aos 15, 30 e 60º dia pós-infecção.

\*, \*\*, \* Diferença significativa  $p < 0,05$

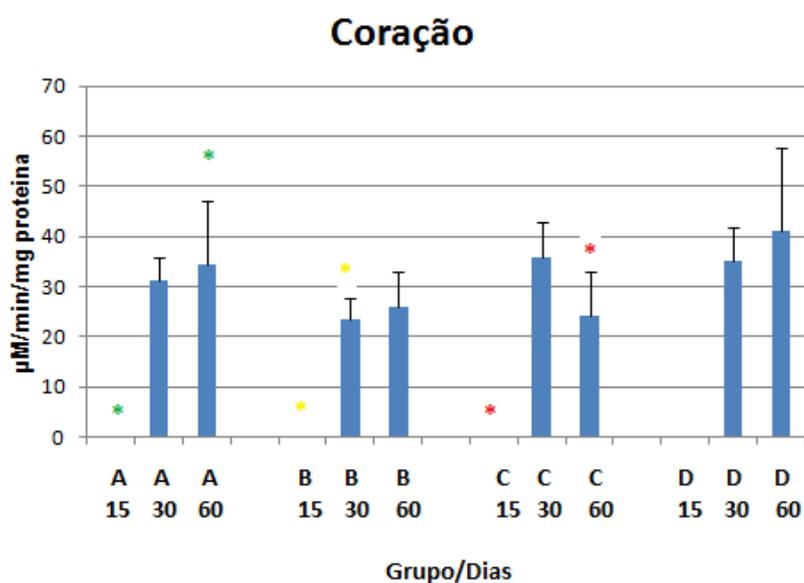


Figura 2. Valores médios e desvio padrão para atividade enzimática da G6PD em tecido de coração aos 15,30 e 60º dia pós-infecção.

\*, \*\*, \* Diferença significativa  $p < 0,05$

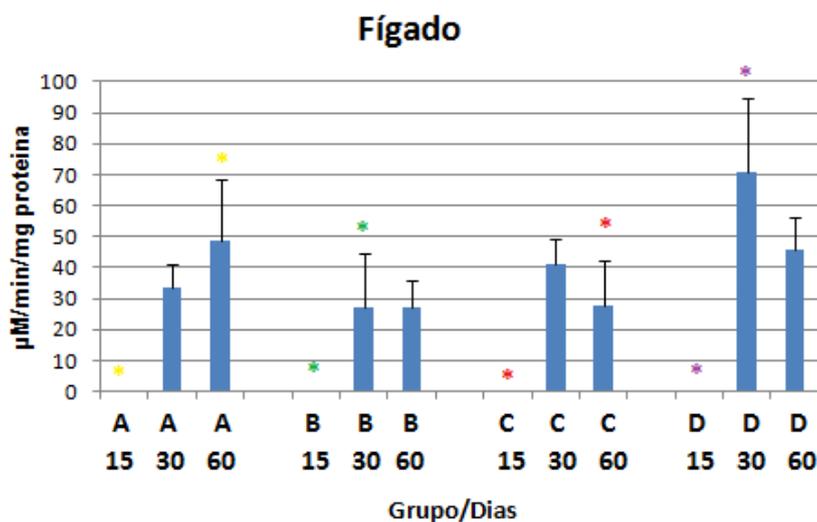


Figura 3. Valores médios e desvio padrão para atividade enzimática da G6PD em fígado aos 15,30 e 60º dia pós-infecção.

\*, \*\*, \* Diferença significativa  $p < 0,05$

Em relação ao FRAP no 15º dia de infecção, o uso de vitamina C ou não nos camundongos infectados ou não infectados não gerou dados estatisticamente significativos nos tecidos muscular, cardíaco e hepático. A relevância das associações obtidas nos mostrou que a atividade antioxidante foi maior nos animais infectados com *T. cruzi*. Resultado este que também se repetiu no músculo ao 30º dia.

Houve um aumento da capacidade antioxidante no decorrer dos primeiros 30 dias nos animais do grupo A em todos os tecidos.

Em relação ao músculo do grupo D, nos últimos 30 dias de fase aguda, houve diminuição da capacidade antioxidante.

O período de 45 dias de uso de vitamina C no grupo B aumentou a capacidade antioxidante total do coração e fígado. Entretanto no intervalo que se estendeu de 15 para 30 dias, houve uma diminuição da capacidade antioxidante total no tecido hepático dos animais do grupo C.

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
	<b>15 dias</b>			
Músculo	12,59 (3,10)	9,40 (2,38)	31,39 (12,68)	24,67 (7,59)
Coração	17,60 (5,78)	11,77 (5,78)	39,19 (11,01)	25,97 (7,59)
Fígado	15,66 (1,97)	14,04 (1,46)	54,49 (11,55)	33,37 (7,92)
	<b>30 dias</b>			

Músculo	22,09 (2,4)	17,5 (2,75)	27,54 (7,92)	34,79 (7,61)
Coração	31,57 (3,24)	20,45 (2,91)	24,46 (7,7)	28,58 (5,39)
Fígado	26,09 (2,8)	21,53 (4,12)	29,22 (3,84)	34,46 (7,63)
<b>60 dias</b>				
Músculo	14,51 (2,07)	17,22 (4,52)	20,19 (8,32)	18,86 (6,02)
Coração	22,06 (4,66)	25,07 (2,98)	24,73 (1,61)	25,95 (2,76)
Fígado	25,8 (4,93)	25,1 (2,88)	29,74 (4)	31,96 (13,95)

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão para a capacidade antioxidante tecidual determinada pela concentração do FRAP (mM/ mg de proteína)

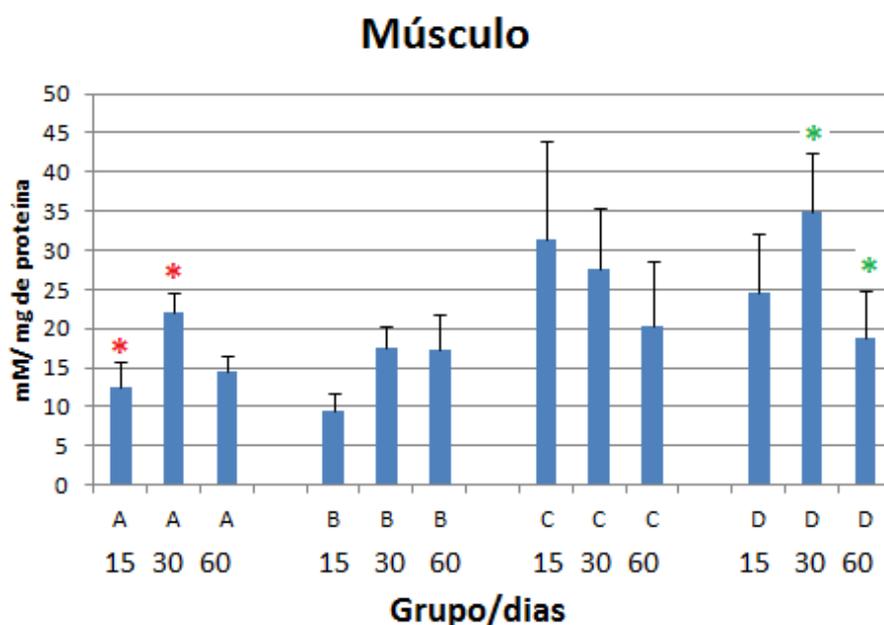


Figura 4. Valores médios da capacidade antioxidante total pelo método FRAP e desvio padrão no músculo esquelético nos períodos de 15, 30 e 60 dias pós-infecção.

\*, \* Diferença significativa  $p < 0,05$

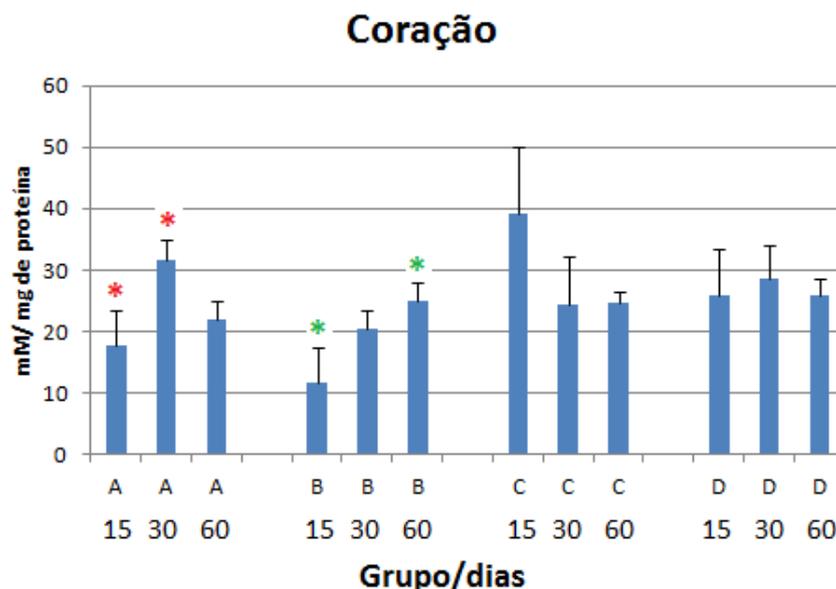


Figura 5. Valores médios da capacidade antioxidante total pelo método FRAP e desvio padrão no coração nos períodos de 15, 30 e 60 dias pós-infecção.

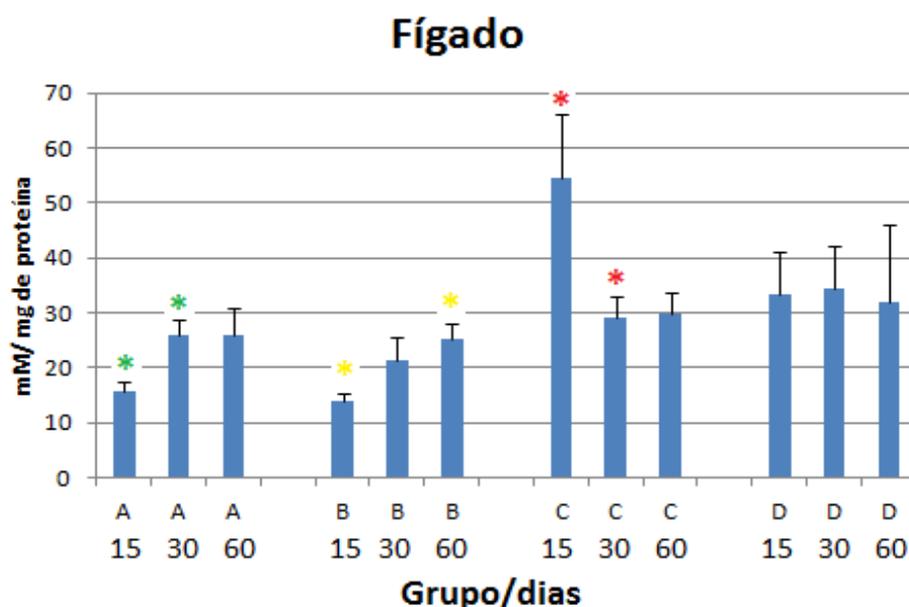


Figura 6. Valores médios da capacidade antioxidante total pelo método FRAP e desvio padrão no fígado nos períodos de 15, 30 e 60 dias pós-infecção.

\*,\*\* Diferença significativa  $p < 0,05$

## 4 | DISCUSSÃO

Na infecção aguda por *T. cruzi*, além do processo inflamatório vigente, macrófagos e neutrófilos ativados promovem liberação de radicais livres de oxigênio e de nitrogênio, que contribuem para o estresse oxidativo que pode ser agravado pela liberação de toxinas do parasita (GUPTA; WEN; GARG, 2009).

O aumento do perfil antioxidante não enzimático determinado pelo FRAP na vigência de infecção foi observado em todos os tecidos aos 15 dias e também no músculo no 30º dia. Segundo SAMUDI et al. (2009), a presença de uma infecção

interfere na regulação da enzima xantina oxidase. Esta, em sua forma desidrogenase, converte a xantina, que é um produto gerado na tentativa de erradicação do parasita através da produção de radicais superóxidos, em ácido úrico. Esta substância é um poderoso antioxidante que contribui em até 60% da atividade FRAP (BENZIE; STRAIN, 1996).

A suplementação de vitamina C nos animais do grupo D pode ter sido prejudicial, pois a diminuição da capacidade antioxidante observada neste grupo pode ser explicada por um efeito pró-oxidante da vitamina C, uma vez que o ácido ascórbico, na presença de íons  $Fe^{2+}$ , atua como pró-oxidante pela estimulação da reação de Fenton (DUARTE; LUNEC, 2005), gerando  $Fe^{3+}$  e radicais hidroxila através da interação entre peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e  $Fe^{2+}$ , sendo estas as substâncias mais deletérias para o organismo devido sua meia vida curta e dificuldade de serem neutralizadas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Da mesma forma, a diminuição da atividade FRAP encontrada no fígado de animais do grupo C na evolução de 15 para 30 dias denota uma diminuição dos níveis de antioxidantes não enzimáticos possivelmente pelo consumo dos mesmos frente à persistência da infecção com a geração de radicais livres e peroxidação lipídica. Frei, England e Ames (1989) estabeleceram a ordem de consumo dos antioxidantes no plasma na presença de peroxidação lipídica, sendo que a vitamina C e tióis foram os primeiros a serem consumidos, seguidos por bilirrubina, urato e alfa tocoferol.

Entretanto na ausência de infecção, observou-se aumento na capacidade antioxidante nos tecidos cardíaco e hepático no decorrer do 15° ao 60° dia nos animais do grupo B, provavelmente pela administração exógena de vitamina C, a qual pode contribuir em 15% na atividade do FRAP (BENZIE; STRAIN, 1996).

Os resultados obtidos no G6PD mostraram diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo A quando comparado ao grupo D no músculo esquelético e no fígado, separadamente, no 30° dia pós-inoculação, propiciando inferir que houve o aumento do estresse oxidativo, uma vez que a G6PD atua indiretamente na neutralização de espécies reativas de oxigênio, aumentando sua atividade enzimática quando há processos de estresse oxidativo e que isto seja devido à infecção e/ou à suplementação com vitamina C. Além disso, também quando a vitamina C esteve associada à infecção, observou-se os maiores valores de estresse oxidativo, levando-nos a questionar a hipótese de ambas adicionarem seus efeitos pró-oxidativos, como pode ser observado no grupo D entre o 15° e 30° dia no músculo esquelético e no fígado, separadamente, no qual nota-se um aumento enzimático no decorrer do tempo e também no músculo no 30° dia, entre o grupo B com o grupo D.

Assim, há a possibilidade de a vitamina C não ter efeito contra a multiplicação parasitária, como tem sido mostrado, em recentes estudos, em que alguns parasitas, através do ácido ascórbico, podem diminuir enzimas antioxidantes dependentes de ascorbato presente em tecidos infectados, podendo-se proteger da ação oxidante de ROS e das espécies reativas do nitrogênio (RNS) produzido pelas células inflamatórias

hospedeiras (MONTEIRO G. et al., 2007; LOGAN et al., 2007). Sendo assim, apesar da suplementação com vitamina C, os parasitas sobreviveriam e elevariam a atividade oxidativa causando dano ao hospedeiro.

Além disso, enquanto no músculo foram encontrados os menores valores de atividade enzimática quando comparado aos demais tecidos no 30° e 60° dia pós-infecção, o fígado apresentou os maiores valores nesses períodos, corroborando com os resultados obtidos por DI MEO et al. (1996), onde mostrou que o fígado possui maior capacidade antioxidante que o coração seguido do músculo esquelético.

Além disso, acreditamos que valores significativos ( $p < 0,05$ ) no grupo B entre os 15° e 30° dias no músculo, coração e fígado, sejam devidos possivelmente somente à suplementação de vitamina C levando ao aumento da atividade oxidativa no decorrer dos dias, de maneira que segundo alguns autores, dependendo da dose de vitamina C, esta pode atuar como pró-oxidante (PADAYATTY et al., 2003; FERREIRA, MATSUBARA, 1997).

Ainda, no músculo, coração e fígado, separadamente, no grupo C foi observado  $p < 0,05$  entre o 15° e 60° dias, com aumento da atividade da G6PD possivelmente devido somente à infecção, com o aumento do estresse oxidativo no decorrer dos dias.

Pode-se discutir as possíveis ações da vitamina C, nos três tecidos, ou seja, ter um efeito pró-oxidativo no início da infecção/tratamento, já que com 30 dias há um aumento significativo do estresse oxidativo, enquanto que com a infecção ocorreu com aproximadamente 60 dias pós-infecção.

## AGRADECIMENTOS

A Priscilla Oliveira pela colaboração nos treinamentos de execução dos ensaios bioquímicos em laboratório.

Em memória à Elane de Fátima Taipeiro, nossa querida professora que nos orientou durante todo o processo, com o máximo zelo e carinho.

## CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver nenhum tipo de conflito de interesse no desenvolvimento do estudo.

## SUPORTE FINANCEIRO

FAPESP 2015/09561-0.

## REFERÊNCIAS

ARMITAGE, P.; BERRY, G. *Estadística para la investigación biomédica*. 3. ed. Madrid: Harcourt Brace, 1997.

- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Quím. Nova**, São Paulo, v.29, n.1, p.113-123, Feb. 2006.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70–76, 1996.
- CHAN, A. C.; CHOW, C.K.; CHIU, D. Interaction of antioxidants and their implication in genetic anemia. **Proc. Soc. Exp. Biol Med.**, v. 222, p. 274-282, 1999.
- DI MEO, S.; VENDITTI, T.L. Tissue protection against oxidative stress. **Experientia**, v.52, p. 786, 1996.
- DUARTE, T.L.; LUNEC, J. Review: When is na antioxidant not na antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. **Free Radical Research**, v. 39, n. 7, p. 671-686, July 2005.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. de Assoc. Med. Bras.**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FREI, B.; ENGLAND, L.; AMES, A.N. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. **Proc. Nati. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 6377-6381, August 1989.
- GUPTA, S.; WEN, J. J.; GARG, N. J. Oxidative Stress in Chagas Disease. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2009, p. 1-8, 2009.
- JIALAL, I.; SINGH, U. Is vitamin C an antiinflammatory agent? **Am J Clin Nutr.** v. 83, p. 525–526, 2006.
- KORNBERG, A.; HORECKER, B.L. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. In: **Methods in Enzymology**. SP Colowick, NO Kaplan, Editors, Vol. I, Academic Press, New York, p. 323, 1955.
- LOGAN F.J., et al. The terminal step in vitamin C biosynthesis in *Trypanosoma cruzi* is mediated by a FMN-dependent galactonolactone oxidase. **Biochem. J.**, v. 407, p. 419-426, Nov 2007.
- LOHR, G.W.; WALLER, H.D. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. In: **Methods of Enzymatic Analysis**. HU Bergmeyer, Editor, Academic Press, New York, p. 636, 1974.
- LOWRY O.H., et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 1951.
- MAÇAO, L.B. et al. Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas disease. **Int. J. Cardiol.**, v. 123, p. 43-49, 2007.
- MARIM, R.G. et al. Effects of vitamin C supplementation on the chronic phase of Chagas disease. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 57, n.3, p. 245-250, jun. 2015.
- MARTINS, L.P.A. et al. Rural *Triatoma rubrovaria* from southern Brazil harbors *Trypanosoma cruzi* of lineage IIc. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, p. 427-434, 2008.
- MCCORD, J.M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **Am. J. Med.**, v. 108, n. 8, jun. 2000.
- MELLO FILHO, A.C.; HOFFMAN, M.E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochemical Journal**, v. 218, p. 273-275, 1984.

MIKIROVA, N.; CASCIARI, J.; TAYLOR, P.; ROGERS, A. Effect of high-dose intravenous vitamin C on inflammation in cancer patients. **Journal of Translational Medicine**, v. 10, p. 189, 2012.

MONTEIRO, G. et al. Redution of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. **Proc. Natl. Acad. Sci, USA**, v. 104, n. 12, p. 4886-4891, 2007.

PADAYATTY, S.J. et al. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. **J Am Coll Nutr.**, v. 22, n. 1, p. 18-35, fev. 2003.

SAMUDI, C. et al. Attenuation of Hydrogen Peroxide and Ferric Reducing/Antioxidant Power Serum Levels in Colorectal Cancer Patients with Intestinal Parasitic Infection. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, v. 16, n. 2, Apr. – Jun. 2009.

VALAVANIDIS, A. et al. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, p. 178-189, 2006.

WEN, J.J.; GARG, N. Oxidative modification of mitochondrial respiratory complexes in response to the stress of *Trypanosoma cruzi* infection. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 12, p.2072–2081, 2004.

## AVALIAÇÃO DOS ÍNDICES DE REGENERAÇÃO HEPÁTICA NO MODELO EXPERIMENTAL DE HEPATECTOMIA A 70%

**Luz Marina Gonçalves de Araujo Oliveira**

Universidade Nove de Julho, Programa de Pós-Graduação em Medicina, São Paulo, SP

**Pedro Luiz Squilacci Leme**

Universidade Nove de Julho, Programa de Pós-Graduação em Medicina, São Paulo, SP

**Maria Cristina Chavantes**

Universidade Nove de Julho, Programa de Pós-Graduação em Medicina, São Paulo, SP

**RESUMO:** *Objetivos:* este estudo procurou padronizar o modelo experimental para estudo da regeneração hepática pelos **índices** morfológicos, histomorfométricos e imunohistoquímicos em ratos Wistar adultos, após hepatectomia parcial a 70%; o período de análise de regeneração em 3, 7 ou 14 dias.

*Métodos:* Vinte e oito ratos machos adultos da raça Wistar foram distribuídos em quatro grupos, conforme tempo de observação após o procedimento cirúrgico: Controle (C), 3 (H.3), 7 (H.7) ou 14 (H.14) dias. O grupo Controle foi submetido a laparotomia; os grupos H3, H7 e H14 foram submetidos à hepatectomia parcial e, posteriormente, após transcorrido o tempo de cada grupo, foram eutanasiados, procedendo-se a retirada do fígado regenerado. A peça da hepatectomia e o fígado regenerado foram pesados, submetidos aos cálculos de volume e índices hepatossomáticos. *Resultados:* Não

houve diferenças nos índices morfológicos (peso, volume hepáticos e IHS) após o período experimental entre os quatro grupos de animais; houve diferenças entre o grupo Controle e os três grupos de estudo do Índice Mitótico; houve diferenças entre os grupos Controle, H3 e H7 comparando-se com o grupo H14 na porcentagem de área positiva para PAS. Houve diferenças entre o Índice de Proliferação dos Hepatócitos aferido por estudo imunohistoquímico por PCNA do grupo controle nos três grupos de estudo. *Conclusão:* analisamos os índices morfológicos, histomorfométricos e imunohistoquímicos para avaliar o Índice de Proliferação dos Hepatócitos pelo PCNA. Estes índices avaliaram as principais características da regeneração hepática: hipertrofia (peso, volume e IHS) e hiperplasia (estudo histomorfométrico e imunohistoquímico) do segmento remanescente do fígado.

**PALAVRAS-CHAVE:** Regeneração hepática. Estudo Histomorfométrico. Imunohistoquímica. Hepatectomia. Ratos.

EVALUATION OF HEPATIC REGENERATION INDICES IN THE EXPERIMENTAL MODEL OF HEPATECTOMY 70%

**ABSTRACT:** The analysis of hepatic

regeneration after partial hepatectomy in rats can be performed through different indices: morphological, histomorphometric and immunohistochemical. *Objectives:* The present study analyzed the characteristics of hepatic biometry as a parameter for monitoring liver regeneration in adult Wistar rats after partial hepatectomy. *Methods:* Twenty-eight male adult Wistar rats were divided into four groups, according to observation time after the surgical procedure: Control (C), 3 (H.3), 7 (H.7) or 14 (H.14) days. The Control group underwent laparotomy; The H3, H7 and H14 groups underwent partial hepatectomy and, after the time elapsed after each group, were euthanized, and the regenerated liver was removed. The hepatectomy specimen and the regenerated liver were weighed, submitted to calculations of volume and hepatosomatic index. *Results:* There were no differences in the morphological indices (weight, hepatic volume and IHS) after the experimental period among the four groups of animals; There was a strong correlation between hepatic weight x volume in the Control, H3 and H7 groups; IM x PCNA in group H3, volume x PCNA in group H14, positive correlation between volume x IHS and negative correlation between IHS x IM in the H7 group. There were differences between the Control group and the three study groups of the Mitotic Index. There were differences between the Control, H3 and H7 groups, comparing with the H14 group in the percentage of positive area for SBP. There were differences between the Hepatocyte Proliferation Index verified by immunohistochemical study by PCNA of the control group with the three study groups. *Conclusion:* we analyzed the morphological, histomorphometric and immunohistochemical indices to evaluate the Proliferation Index of Hepatocytes by PCNA. These indices evaluated the main characteristics of hepatic regeneration: hypertrophy (weight, volume and IHS) and hyperplasia (histomorphometric and immunohistochemical study) of the remaining segment of the liver.

**KEYWORDS:** Liver regeneration. Morphology. Histomorphometric study. Immunohistochemistry. Hepatectomy. Rats.

## INTRODUÇÃO

A habilidade extraordinária do fígado em regenerar-se após ressecção ou lesão tem fascinado médicos, cientistas e leigos ao longo da história da humanidade. A mitologia grega, historicamente, foi a primeira a abordar o tema acerca da capacidade de regeneração do fígado. A citação mais antiga acerca da capacidade regenerativa hepática foi descrita por Hesíodo (750-700 A.C) em sua obra *Theogony* acerca do mito de Prometeu<sup>9</sup>. Desde então, a regeneração hepática vem despertando grande interesse ao longo da história, mas seus mecanismos permaneceram desconhecidos por centenas de anos. As primeiras descrições científicas sobre o assunto remontam ao século XVII; desde o início do século XX vem sendo estudada sistematicamente. A mais antiga referência bibliográfica sobre regeneração hepática data de 1909. Milne, neste ano, percebeu que qualquer alteração patológica ou experimental levando à destruição de hepatócitos era capaz de desencadear o processo de proliferação

celular hepática<sup>2</sup>. Em 1920, Rous e Larimore reportaram o aumento do volume dos lobos hepáticos não submetidos à ligadura, enquanto o restante do fígado era provido de suprimento portal<sup>11</sup>. Em 1931, Higgins e Anderson publicaram seu trabalho onde apresentaram a dinâmica da regeneração hepática após HP a 70 % em ratos, sendo esta técnica empregada até hoje<sup>6</sup>.

A regeneração do fígado é o processo que envolve hiperplasia (aumento do número de células) e hipertrofia (aumento do volume celular ou do conteúdo proteico na fase pré-replicação). O conceito de regeneração é usado comumente na literatura; no entanto, regeneração hepática é primariamente um processo de hiperplasia compensatória, a qual é dirigida mais por necessidades funcionais do que anatômicas<sup>5</sup>. Logo, apesar de ser amplamente empregado na literatura, o termo “regeneração” não é adequado do ponto de vista biológico, uma vez que a resposta desencadeada pelo dano tecidual hepático promove hiperplasia e hipertrofia compensatória do tecido remanescente, até o restabelecimento da massa hepática primitiva. No entanto, os lobos hepáticos ressecados cirurgicamente não são recuperados<sup>8</sup>. Nos últimos anos, surgiram novos conhecimentos sobre os fatores envolvidos no processo de regeneração hepática; acrescentar um fator com efeito potencialmente negativo à regeneração após HP para a restauração hepática desperta interesse para a investigação científica<sup>5</sup>.

Desta forma, o estudo da regeneração hepática avaliada por diversos índices morfológicos, histomorfométricos e imunohistoquímicos pode fornecer informações pertinentes no desenvolvimento do modelo experimental e passível de ser aplicado na investigação científica<sup>4;7;12</sup>.

## MÉTODOS

Este estudo foi realizado no Biotério Central do campus Vergueiro da Universidade Nove de Julho, São Paulo, sendo conduzido de acordo com a lei federal 6.638 de maio de 1979 e após ser autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNINOVE (número de aprovação CEUA Na 0015/2014) e as demais normas aplicáveis à utilização de animais para o ensino e pesquisa, especialmente as resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Vinte e oito ratos machos da raça Wistar, adultos jovens, de peso médio  $533,03 \pm 71,04$  g, foram distribuídos em quatro grupos, conforme tempo de observação após o procedimento cirúrgico: Controle (laparotomia sem hepatectomia), 3 (H3), 7 (H7) e 14 (H14) dias. Os grupos H3, H7 e H14 foram submetidos à HP a 70% com ressecção dos lobos mediano e esquerdo conforme modelo de HIGGINS & ANDERSON e, posteriormente, após o período de estudo, os animais foram eutanasiados e seus fígados removidos (estes apresentavam o segmento em regeneração e o segmento hepático restante pós-hepatectomia); as amostras foram submetidas às análises morfológicas (peso, volume e IHS), histomorfométricas (hematoxilina-eosina para aferição do Índice Mitótico. PAS para quantificação do glicogênio citoplasmático hepático) e imunohistoquímicas pelo

PCNA para aferição do Índice de Proliferação dos Hepatócitos). Para análise estatística, foram utilizados os testes de Kolmogorov-Smirnov para avaliação da normalidade dos dados, One-Way ANOVA, ANOVA de dois fatores (grupo X tempo) e Correlação de Pearson. Os valores de  $p < 0,05$  indicaram significância estatística.

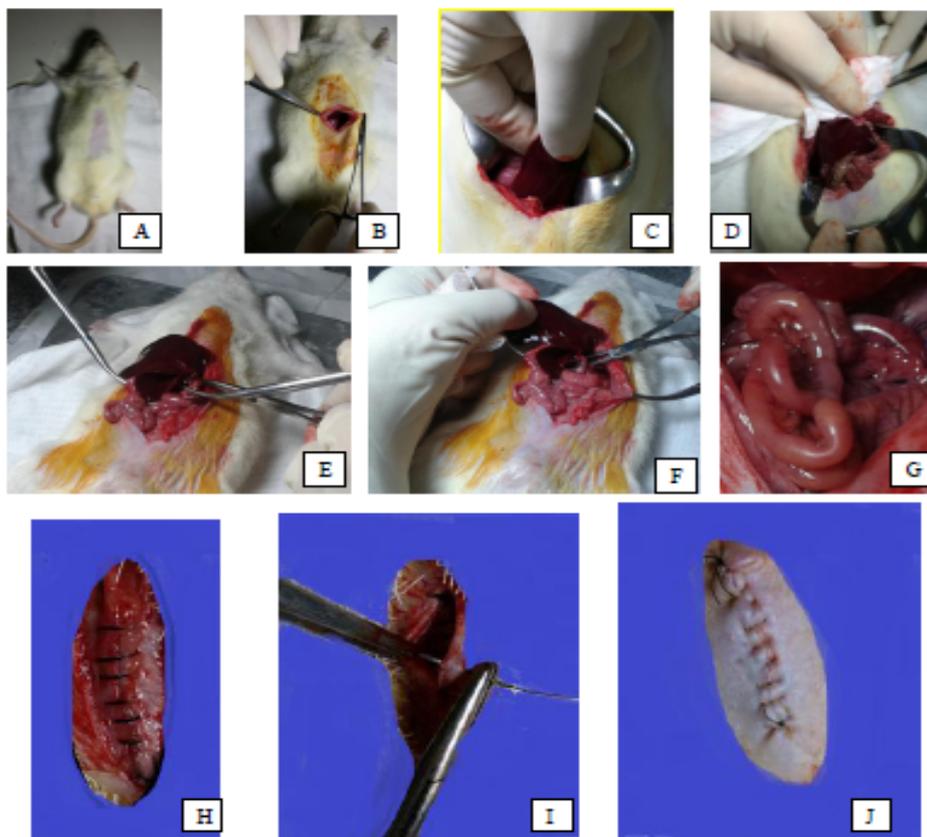


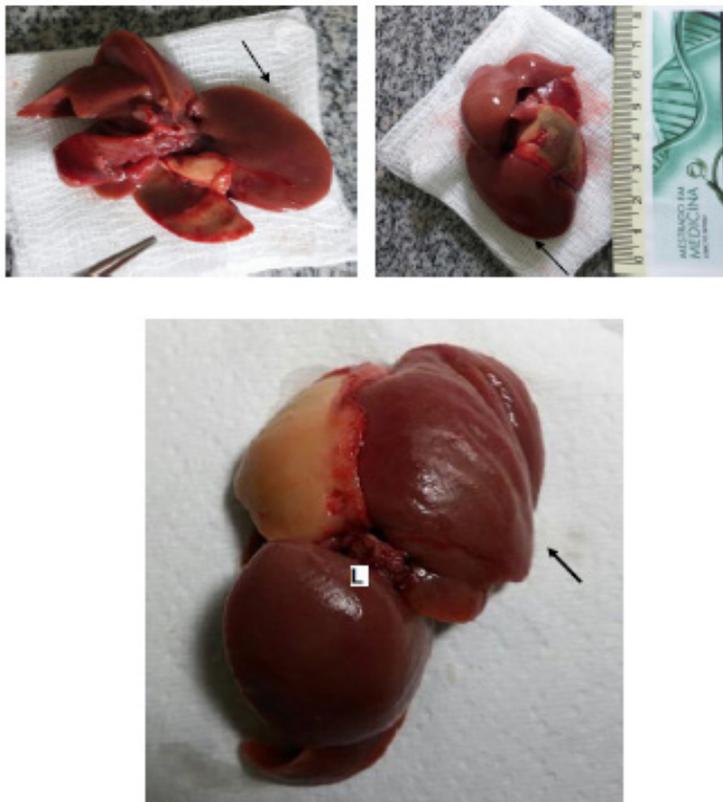
Figura 10 – Fases da 1ª etapa cirúrgica (hepatectomia 70%). (A) Animal anestesiado em posição para a cirurgia. (B) Laparotomia mediana. (C) Abordagem dos lobos esquerdo e mediano. (D) Lobos esquerdo e mediano exteriorizados. (E) Ligadura do pedículo dos lobos. (F) Ligadura do pedículo dos lobos. (G) Cavidade peritoneal após excisão dos lobos hepáticos esquerdo e mediano. (H) Sutura do plano músculo-aponeurótico. (I) Sutura do plano cutâneo. (J) Sutura finalizada. Aspecto final da cicatriz cirúrgica.

Figura 10 – Fases da 1ª etapa cirúrgica (hepatectomia 70%). (A) Animal anestesiado em posição para a cirurgia. (B) Laparotomia mediana. (C) Abordagem dos lobos esquerdo e mediano. (D) Lobos esquerdo e mediano exteriorizados. (E) Ligadura do pedículo dos lobos. (F) Ligadura do pedículo dos lobos. (G) Cavidade peritoneal após excisão dos lobos hepáticos esquerdo e mediano. (H) Sutura do plano músculo-aponeurótico. (I) Sutura do plano cutâneo. (J) Sutura finalizada. Aspecto final da cicatriz cirúrgica.

## RESULTADOS

Não houve diferenças nos índices morfológicos (peso, volume hepáticos e IHS) após o período experimental entre os quatro grupos de animais: grupo controle, grupo de ratos hepatectomizados a 70 % e eutanasiados após 3 dias, 7 dias e 14 dias; houve forte correlação entre peso X volume hepáticos nos grupos Controle, H3 e H7; IM X PCNA no grupo H3, volume X PCNA no grupo H14, correlação positiva entre volume X IHS e correlação negativa entre IHS X IM no grupo H7. Houve diferenças entre o grupo Controle e os três grupos de estudo do Índice Mitótico. Houve diferenças entre os

grupos Controle, H3 e H7 comparando-se com o grupo H14 na porcentagem de área positiva para PAS. Houve diferenças entre o Índice de Proliferação dos Hepatócitos aferido por estudo imunohistoquímico por PCNA do grupo controle com os três grupos de estudo.



Fígado de ratos do grupo H3 demonstrando aspecto macroscópico da área de segmento hepático restante pós-hepatectomia (amarela) e área hiperplásica (setas). A ligadura do pedículo realizada na HP está demonstrada na seta.



Fígado de ratos do grupo H7 demonstrando aspecto macroscópico da área hiperplásica apontada pelas setas. A pinça aponta para a área de segmento hepático restante pós-hepatectomia em amarelo. A ligadura do pedículo realizada na HP está demonstrada na seta.



Fígado de ratos do grupo H14 demonstrando aspecto macroscópico da área hiperplásica apontada pelas setas. A ligadura do pedículo realizada na HP está demonstrada na seta.

### Correlação múltipla entre os índices morfológicos, histomorfométricos e imunohistoquímicos em cada grupo

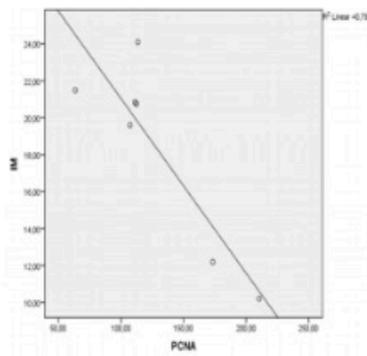


Gráfico de correlação entre IM e PCNA no grupo H3  
 $p=0,007$ ;  $r=0,889$

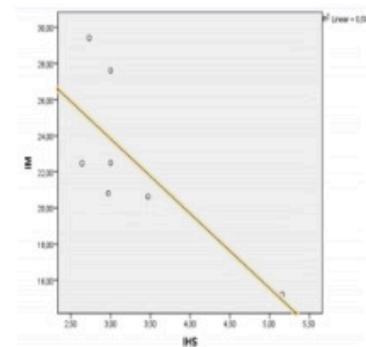


Gráfico de correlação entre IM e IHS do grupo H7  
 $=0,046$ ;  $r=0,763$

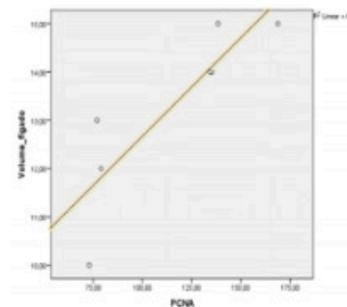
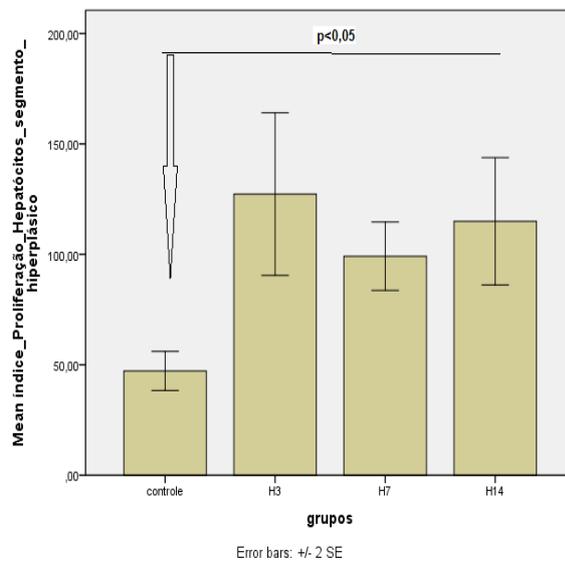
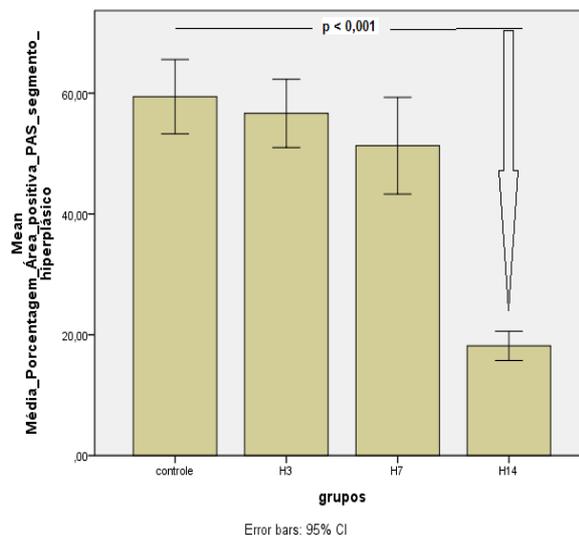
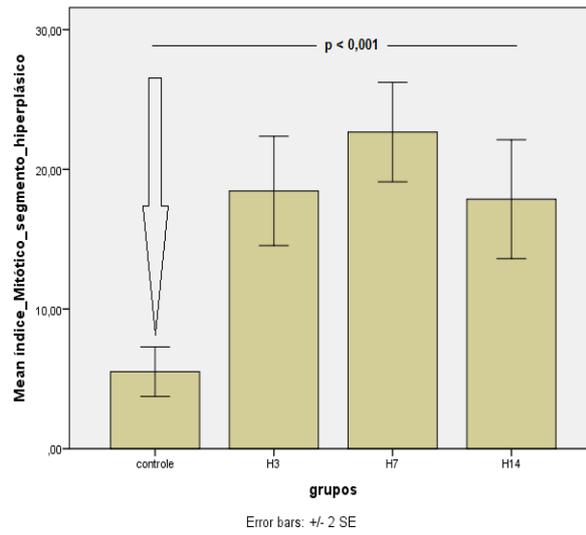
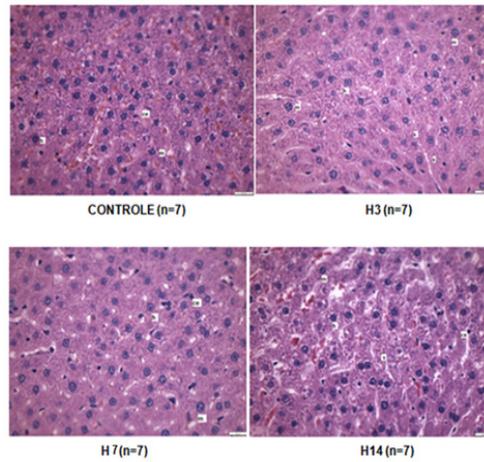


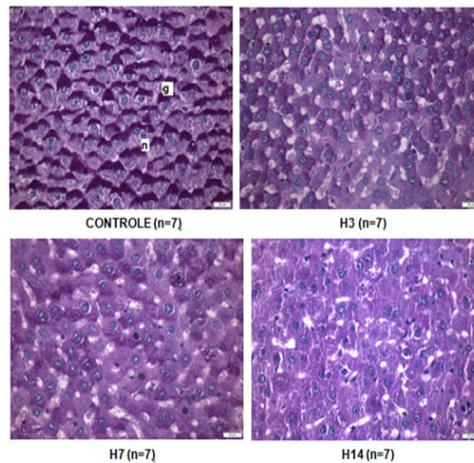
Gráfico de correlação entre volume hepático e PCNA no grupo H14  
 $P=0,012$ ;  $r=0,864$

## Índices Histomorfométricos e Imunohistoquímicos

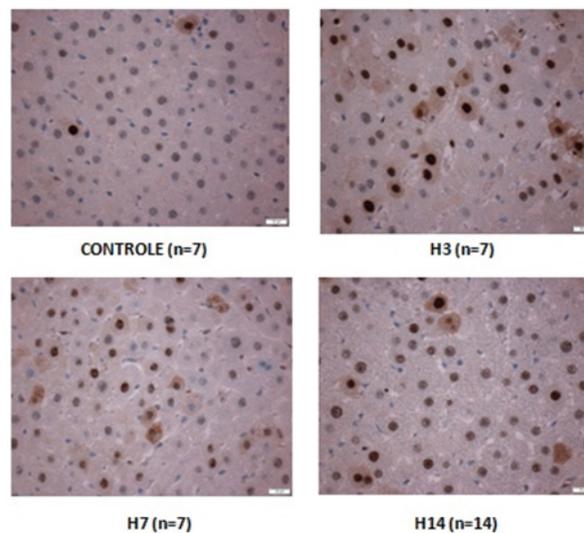




Fotomicrografias do fígado de rato macho Wistar, do grupo Controle, e do segmento hiperplásico dos fígados dos grupos H3, H7 e H14, indicando: parênquima hepático com formação sinusoidal típica (s) com hepatócitos de núcleo denso (h) e células epiteliais (ce). As áreas demarcadas indicam figuras de mitose (m). Coloração HE; aumento de 400 X.



Fotomicrografias do fígado de rato macho Wistar, do grupo Controle, e do segmento hiperplásico dos fígados dos grupos H3, H7 e H14, indicando: grânulos de glicogênio (g) corados em magenta no citoplasma dos hepatócitos e núcleo (n) corado em azul. Coloração PAS/Hematoxilina, 400 X.



Fotomicrografias do fígado de rato macho Wistar, do segmento hiperplásico dos fígados dos animais dos grupos Controle, H3, H7 e H14, coradas pelo PCNA, demonstrando a presença de núcleos positivos corados em castanho e núcleos negativos em azul. Aumento de 400 X.

## DISCUSSÃO

Ao longo das últimas décadas, muitas pesquisas sobre os mecanismos da regeneração hepática foram realizadas, objetivando-se analisar os efeitos positivos e negativos de diversos fatores sobre este processo, como a ação de fármacos, nutrientes, plantas, hormônios, doenças metabólicas como diabetes melitus e tireoidopatias, laser de baixa potência, procedimentos cirúrgicos, tumores, dentre outros<sup>1</sup>. Diversos índices podem ser utilizados para análise do processo de regeneração hepática; variáveis moleculares, bioquímicas, morfológicas, histomorfométricas e imunohistoquímicas são as mais empregadas, mas a literatura diverge consideravelmente sobre quais métodos de avaliação são mais indicados em diferentes situações<sup>1;2;3;10;13</sup>. Em nosso estudo, procuramos avaliar os índices que caracterizam os dois aspectos fundamentais da regeneração hepática: índices morfológicos, histomorfométricos e imunohistoquímicos que avaliam a hipertrofia e hiperplasia hepáticas<sup>8</sup>. Desta forma, pudemos avaliar os índices mais indicados e o tempo em que o processo de regeneração se deu de modo satisfatório<sup>14</sup>.

## CONCLUSÕES

Esta pesquisa demonstrou que, pelas análises realizadas, recomendamos a análise dos índices morfológicos, histomorfométricos e imunohistoquímicos empregados neste estudo: dentre os índices morfológicos, peso, volume hepáticos e IHS; dentre os índices histomorfométricos, a quantificação do glicogênio hepático pela coloração PAS; e o estudo imunohistoquímico para avaliar o Índice de Proliferação dos Hepatócitos pelo PCNA. Estes índices avaliaram as principais características da regeneração hepática: hipertrofia (peso, volume e IHS) e hiperplasia (estudo histomorfométrico e imunohistoquímico) do segmento remanescente do fígado. Em relação ao tempo de estudo para regeneração hepática, recomendamos o período de 7 dias, pois foi neste período que se deu a regeneração satisfatória. A partir deste modelo, objetivamos impulsionar os pesquisadores a realizar diversos estudos, e desta forma contribuir para novas descobertas no campo da regeneração hepática, tendo em vista que fatores que aceleram ou inibem este processo são de grande relevância no campo da cirurgia hepática, especialmente no que se refere à sobrevivência dos pacientes submetidos a grandes ressecções hepáticas por tumores ou trauma e nos transplantes hepáticos intervivos. Tendo em vista que o processo de regeneração é fundamental tanto para o doador quanto para o receptor, este último aspecto se constitui no grande desafio atual nas pesquisas sobre regeneração hepática.

## REFERÊNCIAS

- Aguiar, L.R.F.; Nassif, P.A.N.; Ribas, C.A.P.M.; Czezczko, N.G.; Ribas.; Marinho Júnior, C. H.; Wendler, E. **Liver regeneration after partial hepatectomy in rats with post-hepatic portal hypertension.** ABCD Arq Bras Cir Dig, 2011; 24(1): 144-151.
- Aloia, T.P.A. **Efeitos de fatores hepatotróficos no fígado de ratos Wistar.** Dissertação de Mestrado. 2006. Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- Assy, N., Minuk. Gy. **Liver Regeneration: Methods for Monitoring and their Applications.** J Hepatol, 1997; 26 (4):945-52.
- Duclos, J.; Bhangui, P.; Salloum, C.; Andreani, P.; Saliba, S.; Ichai, P.; Elmaleh, A.; Castaing, D.; Azoulay, D. **Ad Integrum Functional and Volumetric Recovery in Right Lobe Living Donors: Is It Really Complete 1 Year After Donor Hepatectomy ?** Am. J. Transplant. 2015, Aug 17, pg.1-14.
- Hariri N, Thibault L. **High-fat diet-induced obesity in animal models.** Nutr Res Rev. 2010 Dec; 23(2): 270-99.
- Higgins, G.M. & Anderson, R.M. **Experimental pathology of the liver: I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal.** Arch. Pathol., 1931; 12: 186-202.
- Ivanovska. T.; Schenk, A.; Dahmen,U.; Hahn, H.K.; Linsen,L. **Automatic Hepatocyte Quantification from Histological Images: Comparing Pre-smoothing Filters.** 2008, Eurographics Workshop on Visual Computing for Biomedicine, Germany.
- Jesus, R.P.; Waitzberg, D.; Campos, R.G. **Regeneração hepática: papel dos fatores de crescimento e nutrientes.** Rev Ass Med Brasil, 2000; 46(3): 242-54.
- Koniaris, L.G.; McKillop, I. H.; Schwartz, S.; Zimmers, T. A. **Liver Regeneration.** J. Am. Coll. Surg.,2003, vol.197, nº 4, 634-659.
- Medeiros, A. C.; Azevedo, A. C. B.; Oséas, J. M. F.; Gomes, M. D. F.; Oliveira, F.G.; Rocha, K. B. F.; Azevedo, Í. M.; Rego, A. C. M.; Carvalho, M.D.F. **The ileum positively regulates hepatic regeneration in rats.** Acta Cir. Bras. 2014, Vol. 29 (2) 2014 – 93.
- Rous, P.; Larimore, L.D. **Relation of the Portal Blood to Liver Maintenance. A Demonstration of Liver Atrophy Conditional on Compensation.** JEM, 1920, vol. 31 no. 5, 609-632.
- Trotta, M.R. **Efeito da hepatectomia parcial associada à administração de fatores nutricionais hepatotróficos sobre a morfologia, função e expressão de genes pró-fibróticos na cirrose hepática em ratos Wistar induzida por tiocetamida.** Dissertação de Mestrado. Programa de Fisiopatologia Experimental. 2011. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
- Viana, L.C. **Efeito dos extratos aquosos de *Hyptis Fruticosa* e *Baccharis Trimeris* sobre a proliferação do fígado após hepatectomia parcial em ratos.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente, 2013. Universidade Tiradentes.
- Wei, W., Dirsch, O.; McLean, A.L.; Zafarnia, S.; Schwier, M.; Dahmen, U. **Rodent models and imaging techniques to study liver regeneration.** Eur Surg Res.2015; 54(3-4):97-113.

## BIOTECNOLOGIA NO CONTROLE DE MOSQUITOS TRANSMISSORES DE ARBOVIROSES: BIOENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA EM MOSQUITOS ADULTOS

### **Fabíola da Cruz Nunes**

Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Biologia Celular e Molecular, João Pessoa-PB.

### **Louise Helena Guimarães de Oliveira**

Universidade Federal da Paraíba, Curso de Graduação em Biotecnologia, João Pessoa-PB.

### **Patrícia Alexandria Paiva Silva de Sousa**

Universidade Federal da Paraíba, Curso de Graduação em Biotecnologia, João Pessoa-PB.

### **Hyago Luiz Rique**

Universidade Federal da Paraíba, Curso de Graduação em Biotecnologia, João Pessoa-PB.

**RESUMO:** Atualmente, diversas arboviroses vem causando preocupação ao redor do mundo. Dengue, febre amarela urbana, zika e chikungunya afetam grande número de pessoas, sobretudo em países tropicais como o Brasil. Diversas estratégias de controle dessas doenças vem sendo estudadas, tais como vacinas e terapias antivirais. Apesar disso, a principal forma de combate consiste no controle dos mosquitos vetores, sobretudo através da eliminação mecânica dos criadouros e da utilização de inseticidas. Infelizmente, tais esforços não tem sido suficientes para manter essas doenças controladas. Dessa forma, pesquisas que enfoquem no controle dos mosquitos são de grande importância. O objetivo desse capítulo é descrever metodologias para

estudos de atividade inseticida em mosquitos adultos. Como metodologia, foram propostos três bioensaios utilizando *Aedes aegypti*: teste de contato tarsal, teste de contato corporal e teste de ingestão. Como resultados, observou-se que as três metodologias são adequadas para estudo de atividade inseticida contra mosquitos adultos e fornecem informações sobre qual a melhor via de utilização do inseticida estudado. O teste de contato tarsal simula a aplicação de inseticidas sobre superfícies e é adequado para estudo sobre o efeito residual dos inseticidas sobre os mosquitos. Já o teste de contato corporal, simula a aplicação direta do inseticida sobre o mosquito, enquanto o teste de ingestão é adequado para estudo em que se pretende desenvolver iscas de alimentação. Conclui-se que as metodologias propostas são de simples execução, baixo custo e de grande utilidade para pesquisas de novas substâncias inseticidas que possam ser utilizadas no combate aos mosquitos vetores de arboviroses.

**PALAVRAS-CHAVE:** Arbovírus, *Aedes aegypti*, inseto.

**ABSTRACT:** Currently, many arboviruses is causing concern around the world. Dengue, urban yellow fever, zika and chikungunya affect large numbers of people, especially in tropical countries like Brazil. Several strategies to control these diseases have been studied, such as

vaccines and antiviral therapies. Nevertheless, the main way to combat those consists in the control of mosquito vectors, particularly by mechanical removal of breeding and use of insecticides. Unfortunately, such efforts have not been enough to keep these diseases under control. Therefore, research that focuses on mosquito control are so important. The aim of this chapter is to describe methodologies for insecticidal activity studies in adult mosquitoes. As methods, three bioassays were proposed using *Aedes aegypti*: tarsal contact test, body contact test and ingestion test. As results, the three methodologies were adequate to study insecticidal activity against adult mosquitoes. These methods provide information on the best way of using the insecticide studied. The tarsal contact test simulates the application of insecticides on surfaces and is suitable for study on the residual effect of insecticides on mosquitoes. On the other hand, the body contact test simulates the direct application of the insecticide on the mosquito, while the ingestion test is adequate to develop feeding baits. As conclusion the results show that the proposed methodologies are simple, low cost and very useful for research on new insecticides that can be used to combat mosquito vectors of arboviruses.

**KEYWORDS:** arboviruses, *Aedes aegypti*, insect.

## 1 | INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a saúde pública tem enfrentado um importante desafio de conter o inseto *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762), uma vez que é considerado o principal vetor dos vírus da dengue, chikungunya e zika (Terra et al, 2017). As evidências existentes apontam que o *Ae. aegypti* se originou na África tropical, habitando ambientes silvestres, como escavações em rochas e troncos de árvores. Com o passar do tempo essa espécie adaptou-se aos centros urbanos, onde as alterações provocadas pelo homem propiciam sua proliferação. No continente americano, acredita-se que tenha sido transportada em barris que vinham dos navios de exploradores e colonizadores (Dive, 2007). Nas terras brasileiras, as primeiras suspeitas ligadas ao mosquito apareceram em meados do século XVIII, época em que havia o comércio de escravos negros vindos da África. Porém, somente no final do século XIX que cientistas passaram a estudar detalhadamente o inseto, vindo então a descobrir as doenças que estes eram capazes de provocar, além de descobrir formas de combatê-los. O *Ae. aegypti* apresenta grande capacidade de adaptação a criadouros artificiais, o que possibilita o aumento de sua população e, por conseguinte, o aparecimento de epidemias devido ao seu hábito antropofílico (Consoli & Oliveira, 1994).

Controlar o *Ae. aegypti* tem sido um grande e importante desafio, principalmente em países emergentes. Até em situações onde recursos são liberados especificamente para a aplicação de programas de combate ao vetor, na maioria das vezes não se tem alcançado sucesso. Os problemas de infraestrutura das cidades, como baixas

coberturas na coleta de lixo e intermitência no abastecimento de água, são fatores que comprometem a efetividade dos métodos tradicionais de controle do *Aedes sp.* (Zara et al., 2016; Coelho, 2008).

Atualmente o território brasileiro passa por um momento com alta incidência de arboviroses (dengue, chikungunya e zika), mas além disto, alguns dados epidemiológicos apontam números preocupantes de casos graves e muitos óbitos. Outro problema atual é a associação do zika vírus com a síndrome de Guillain-Barré e, principalmente, com a transmissão vertical, resultando em casos de microcefalia, que têm sido motivo de alarme nacional e internacional (Terra et al, 2017).

Para a redução da densidade populacional do *Ae. aegypti*, recomenda-se o controle integrado. O controle integrado é um conjunto de ações preventivas e corretivas, para impedir a atração, abrigo, acesso ou proliferação de vetores e pragas urbanas e, como parte deste controle, o uso de inseticidas e repelentes ambientais. No entanto, tal prática tem levado à seleção de populações de insetos resistentes. Dessa forma, faz-se necessário buscar métodos alternativos que sejam mais seguros, eficazes, com preços acessíveis e biodegradáveis (Silva et al., 2014; Brasil, 2016b).

Além dos problemas relacionados à toxicidade, o surgimento da resistência por parte do *Aedes aegypti* aos inseticidas químicos mais utilizados tem sido reportada por diversos autores (Luna, 2004; Horta, 2011). O Brasil possui um alto potencial de recursos naturais para o desenvolvimento de inseticidas a partir da flora nativa. Neste contexto, pesquisadores vem utilizando a biotecnologia para explorar nossos recursos naturais e desenvolver novos inseticidas (Nunes et al., 2014; Oliveira et al., 2015; Fernandes et al.,2018). Dessa forma, este estudo tem como objetivo analisar 3 metodologias para avaliação da atividade inseticida em mosquitos adultos, simulando diferentes formas de aplicação de inseticidas.

## 2 | METODOLOGIA

### Bioensaios para avaliação da atividade aduicida

#### *Insetos*

Para esse estudo, foram utilizados mosquitos da espécie *Aedes aegypti*, da linhagem Rockfeller João Pessoa, obtidos de uma colônia cíclica mantida a mais de sete anos no Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Parasitas e Vetores (LAPAVET), do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba. As populações da linhagem Rockfeller, são caracterizadas como uma linhagem padrão de mosquito, susceptível a classe de inseticidas químicos derivados de produtos naturais. Estes são utilizados como referência em estudos de monitoramento de resistência comparados com os mosquitos existentes nas cidades brasileiras (FRANÇA, 2015).

O ciclo do *Ae. aegypti* é mantido dentro de uma câmara climatizada do tipo Biological Oxygen Demand (BOD), sob condições de temperatura controlada de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa do ar  $75 \pm 5\%$  e fotoperíodo de 12 horas de claro e escuro (WHO, 2013; IMAM et al. 2014; NUNES et al. 2015). A utilização de condições normalizadas de manutenção do ciclo de vida do mosquito para ensaios laboratoriais é essencial para garantir a confiabilidade e reprodutibilidade dos dados (WHO, 2013). Foram utilizados nos experimentos, ovos, larvas no quarto estágio de desenvolvimento (L4), pupas e mosquitos adultos de *Ae. aegypti*.

### Substâncias teste

Para os bioensaios utilizou-se o extrato liofilizado de *Agave* híbrida 11648 e o extrato liofilizado de *Agave sisalana*, ambos fornecidos pela Embrapa Algodão – Campina Grande. O cultivo foi feito na cidade de Monteiro, na Paraíba. O extrato foi obtido a partir da moagem das folhas em moinho manual até a completa extração da seiva clorofilada e posteriormente foi submetido a filtragem e ao processo de liofilização até completa secagem da amostra. A amostra foi acondicionada em recipiente, ao abrigo da luz e em temperatura ambiente até o momento da utilização. A concentração testada foi a de 10 mg/mL.

### Teste de contato tarsal

A metodologia proposta tem a intenção de simular a aplicação intradomiciliar de inseticidas e seu poder residual nas paredes dos ambientes. Neste ensaio, utilizou-se como substância teste, os extratos liofilizados de *Agave sisalana* e *Agave híbrida* 11648 diluídos em água na concentração de 10 mg/mL. A solução teste foi embebida em algodão e passada por toda a parede de um recipiente de plástico de 250 mL, que é deixado secar completamente, antes da transferência dos mosquitos para o mesmo. Dez mosquitos adultos de *Ae. aegypti* com 5 dias de vida, foram transferidos para esses recipientes previamente tratados com as substâncias teste e observados por 24 e 48 horas. No grupo controle negativo, a superfície do copo foi tratada apenas com água destilada, enquanto no controle positivo a superfície foi tratada com inseticida comercial Baygon® à base de Praletrina 0.03%, Cipermetrina 0.1% e Imiprotrina 0.03%. Os testes foram realizados em triplicata.

### Teste de contato corporal

A metodologia proposta tem a intenção de simular a aplicação do inseticida diretamente sobre o mosquito e foi adaptada da WHO (1981). Neste ensaio, vinte mosquitos foram previamente anestesiados pelo frio, sendo mantido em congelador durante 2 minutos. Posteriormente, com o auxílio de uma pipeta automática, receberam 10  $\mu\text{L}$  das substâncias teste dissolvidas em água destilada. Após a aplicação, os mosquitos foram mantidos em condições ideais de desenvolvimento em caixas

plásticas teladas e observados por 24 e 48 horas. Após esse período, os mosquitos foram considerados mortos se não apresentassem nenhum sinal de movimento, deitados no fundo do recipiente plástico e não respondendo à estimulação mecânica (CHOOCHOTE et al. 2006). No grupo controle negativo, as paredes do copo foram tratadas com água destilada. O controle positivo foi composto por 10 mosquitos adultos expostos ao inseticida com composição Imiprotrina 0,02%, Permetrina 0,05% e Esbiostrina 0,1% (NUNES et al. 2015). Para determinar as atividades tarsal e corporal foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade inseticida} = \frac{\text{Número de mosquitos mortos}}{10} \times 100$$

### Teste da ingestão

O teste de ingestão é indicado nos estudos onde se pretende desenvolver iscas inseticidas. Neste ensaio utilizou-se uma caixa de polipropileno com tampa (insetário), sendo a tampa perfurada para fixação do dispositivo de alimentação. Para confecção do dispositivo de alimentação utilizou-se um absorvente interno feminino, o qual foi fixado a tampa da caixa pelo próprio cordão de algodão (Figura 1). No grupo experimental o dispositivo de alimentação foi embebido na solução da substância teste, enquanto no grupo controle, o dispositivo foi embebido numa solução de mel e água a 10%. Utilizou-se dez mosquitos por insetário, os quais tiveram acesso irrestrito apenas ao dispositivo de alimentação. Os mosquitos foram observados durante 48h e os ensaios foram realizados em triplicata.



Figura 1: dispositivo de alimentação utilizado nos testes de ingestão da substância teste.

## 3 | ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada usando o programa GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Diferenças significativas entre os grupos foram analisadas por ANOVA e pós-teste de Tukey ( $P < 0.05$ ).

## 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

As metodologias propostas tem como objetivo avaliar a atividade inseticida de substâncias sintéticas ou naturais. Os principais achados desse estudo foram: No bioensaio de contato tarsal observou-se que o grupo exposto a *A. sisalana* teve 100 % de mortalidade em 24 horas, enquanto o grupo exposto a *Agave* híbrida teve 63% de mortalidade (Figura 2). Já no bioensaio de contato corporal, observou-se que o grupo exposto a *A. sisalana* manteve 100 % de mortalidade em 24 horas, enquanto o grupo exposto a *Agave* híbrida teve sua mortalidade aumentada para 70%, sete por cento, portanto, que nos ensaios de contato tarsal (Figura 2).

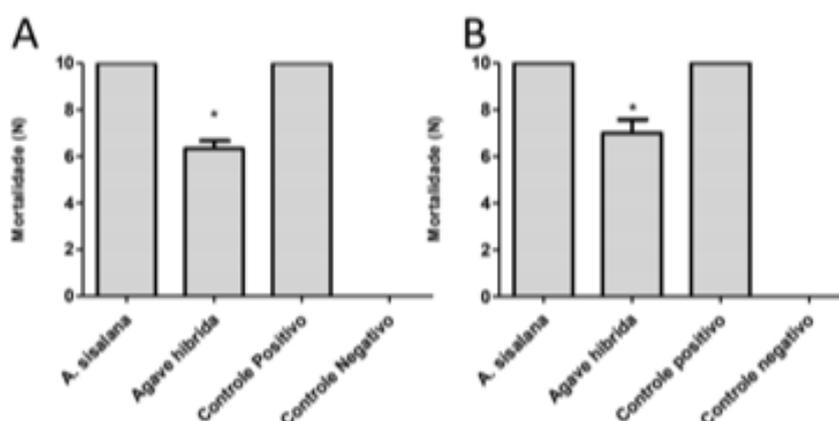


Figura 2: Teste de avaliação da atividade inseticida pelo contato tarsal (A) e corporal (B).

Dessa forma, observou-se que tanto o extrato liofilizado da *A. sisalana* quanto o da *Agave* híbrida 11648 possuem atividade inseticida seja pelo contato do mosquito com superfícies tratadas, como no caso do contato tarsal, seja pela aplicação direta sobre o corpo do mosquito (contato corporal). No caso da *Agave* híbrida, que não tinha atingido 100 % de mortalidade no bioensaio de contato tarsal, observou-se que o efeito foi potencializado quando adotou-se a metodologia do contato corporal, chegando a 100 % de mortalidade, sem aumentar a concentração da substância. Lucena et al. (2011) realizou testes de avaliação da atividade inseticida da *Rhinella marina*, por contato tarsal e corporal com mosquitos adultos. Em seu estudo, utilizando-se apenas a concentração de 100 ppm, a mortalidade passou de 20 para 36%, corroborando os nossos achados.

Um dos grandes achados desse estudo foi em relação ao efeito da ingestão da *Agave* híbrida sobre os mosquito adultos. Os mosquitos não só se alimentaram espontaneamente das soluções de *Agave* como o grupo alimentado com a *Agave* híbrida, na concentração de 5,0 mg/mL, teve 53 % de mortalidade em 24 h (Figura 3). Essa metodologia tem grande utilidade na biotecnologia, sobretudo na confecção de iscas de inseticida, produto inexistente no mercado.

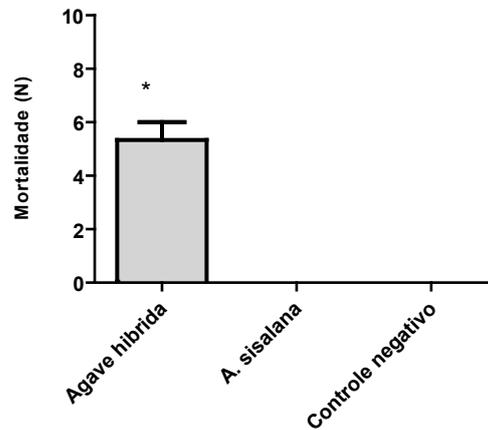


Figura 3: Teste de avaliação da atividade inseticida pelo teste de ingestão.

Em estudo de atividade inseticida realizados por Govindarajam & Sivakumar (2014) e Salmeron (2002). O teste de contato corporal se mostrou mais efetivo, matando os mosquitos num tempo menor se comparado ao teste de contato corporal como podemos observar nos gráficos 5 e 6. Esse efeito já era esperado pois segundo Salmeron (2012), o método é mais sensível, embora a técnica possa não refletir a forma pela qual os insetos são expostos a campo.

O controle do *Ae. aegypti* tem sido dificultado devido ao surgimento de resistência a inseticidas sintéticos. O piriproxyfen utilizado para o controle positivo é um eficaz larvicida, sendo utilizado nas fórmulas de diversos produtos comerciais e com diferentes apresentações (Spray, fumegantes e outros), porém Maoz et al. (2017) fez uma compilação de estudos que relatam a resistência dos insetos a este inseticida. O controle vetorial é o único método amplamente utilizado para prevenção e controle primário das diversas doenças que o *Ae. aegypti* transmite.

Dessa forma, essas metodologias aqui expostas s constituem numa importante ferramenta biotecnológica para o desenvolvimento de novos inseticidas que possam ser utilizados no combate aos vetores das arboviroses.

## 5 | CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados conclui-se que os bioensaios de contato tarsal, corporal e de ingestão são metodologias de fácil execução, baixo custo e muito eficientes no desenvolvimento de novos inseticidas. Essas metodologias, além de determinarem a atividade inseticida de determinada substância, permitem estabelecer qual é a melhor forma de sua utilização, seja por meio de aplicação em superfícies, seja por aplicação direta na forma de spray, ou ainda na forma de iscas alimentares.

## REFERÊNCIAS

BRASIL. **Recomendações técnicas ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária para colaborar no combate ao *Aedes aegypti* e prevenção e controle da Dengue, Chikungunya e infecção pelo vírus Zika.** Brasília-DF, 2016. Disponível em: [http://www.crfsp.org.br/documentos/dengue/Anvisa\\_lanca\\_cartilha\\_com\\_recomendacoes\\_tecnicas\\_para\\_o\\_combate\\_ao\\_Aedes\\_aegypti.pdf](http://www.crfsp.org.br/documentos/dengue/Anvisa_lanca_cartilha_com_recomendacoes_tecnicas_para_o_combate_ao_Aedes_aegypti.pdf). Acesso em 19 de novembro de 2018.

COELHO, G.E. **Dengue: desafios atuais.** Epidemiol Serv Saúde. 17(3): 231 – 3, 2008.

CHOOCHOTE, W., CHAIYASIT, D., KANJANAPOTHI, D., RATTANACHANPICHAI, E., JITPAKDI, A., TUETUN, B., PITASAWAT, B. **Chemical composition and anti-mosquito potential of rhizome extract and volatile oil derived from *Curcuma aromatica* against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).** Journal of Vector Ecology, v. 30, p. 302-309, 2005.

CONSOLI, R.A.G.B; OLIVEIRA, R. L. **Mosquitos de importância sanitária.** 1. Ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1994.

DIVE-SC - Diretoria de Vigilância Epidemiológica da Secretária de Estado de Saúde de Santa Catarina. **Dengue. Orientações técnicas para pessoal de campo.** 2007. Disponível em: [http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/publicacoes/manuais\\_cartilhas/Manual\\_de\\_Campo\\_Dengue.pdf](http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/publicacoes/manuais_cartilhas/Manual_de_Campo_Dengue.pdf). Acesso em 19 de novembro de 2018.

FERNANDES, DA; SOUZA, MSR; TELES, YCF; OLIVEIRA, LHG; LIMA, JB; CONCEIÇÃO, AS; NUNES, FC; SILVA, TMS; SOUZA, MFV. **New Sulphated Flavonoids and Larvicidal Activity of *Helicteres velutina* K. Schum (Sterculiaceae).** Molecules, 23, 2784, 2018.

FRANÇA, L.P. **Avaliação da atividade larvicida de extratos e óleo essencial de *Piper capitarianum* Yunck, 1966 (Piperaceae) sobre *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 e *Anopheles sp* (Culicidae) em laboratório.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas. Manaus-AM, 2015.

GOVINDARAJAN, MARIMUTHU; SIVAKUMAR, RAJAMOHAN. **Ovicidal, larvicidal and adulticidal properties of *Asparagus racemosus* (Willd.)(Family: Asparagaceae) root extracts against filariasis (*Culex quinquefasciatus*), dengue (*Aedes aegypti*) and malaria (*Anopheles stephensi*) vector mosquitoes (Diptera: Culicidae).** Parasitology research, v. 113, n. 4, p. 1435-1449, 2014.

HORTA, M.A.P.; CASTRO, F.I.; ROSA, C.S.; DANIEL, M.C.; MELO, A.L. **Resistance of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to Temephos in Brazil: A Revision and New Data for Minas Gerais State.** BioAssay, v. 6, n.7, 2011.

IMAM, H.; ZARNIGAR, D.; SOFI, G.; AZIZ, S. **The basic rules and methods of mosquito rearing (*Aedes aegypti*).** Tropical Parasitology, v. 4, p. 53-55, 2014.

LUNA, J.D.; MARTINS, M.F.; ANJOS, A.F.; KUWABARA, E.F.; NAVARROSILVA, M.A. **Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina.** Revista de saúde pública, v. 38, n. 6, p. 842-3, 2004.

MAOZ, D.; WARD, T.; SAMUEL, M.; MÜLLER, P.; RUNGE-RANZINGER, S.; TOLEDO, J.; BOYCE, R.; VELAYUDHAN, R.; HORSTICK, O. **Community effectiveness of pyriproxyfen as a dengue vector control method: A systematic review.** PLoS Negl Trop Dis. 17;11(7):e0005651. Jul 2017.

NUNES, F.C.; LEITE, J.A.; OLIVEIRA, L.H.G.; SOUSA, P.A.P.S.; MENEZES, M.C.; MORAES, J.P.S.; MASCARENHAS, S.R.; BRAGA, V.A. **The larvicidal activity of *Agave sisalana* against L4 larvae of *Aedes aegypti* is mediated by internal necrosis and inhibition of nitric oxide production.** Parasitol Res. v. 114, p. 543-549, 2015.

Oliveira, LHG; Sousa, PAPS; Hilario, FF; Nascimento, GJ; Morais, JPS; Medeiros, EP; Sousa, MF;

Nunes, FC. **Agave sisalana extract induces cell death in Aedes aegypti hemocytes increasing nitric oxide production.** Asian Pac J Trop Biomed, 6, 2016.

SALMERON, ELOISA. **Subsídios para o manejo da resistência de Blattella germanica (L., 1767) (Dictyoptera: Blattellidae) a inseticidas.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2002.

Silva, S.L.C; Gualberto, S.A.; Carvalho, K.S.; Fries, D.D. **Avaliação da atividade larvicida de extratos obtidos do caule de Croton linearifolius Mull. Arg. (Euphorbiaceae) sobre larvas de Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae).** Biotemas, Vol. 27, No. 2, pp. 79-85, 2014.

TERRA, M. G.; SILVA, R. S.; PEREIRA, M. G. N.; LIMA, A. F. **Aedes aegypti e as arbovíroses emergentes no Brasil.** Londrina, Vol.30,n.3, pp.52-60 Abril – Jun, 2017.

WHO - World Health Organization. **Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides.** Division of vector Biology and control. WHO/VBC/81.807, Geneva, pp 1-6, 1981.

WHO - World Health Organization. **Guidelines for Efficacy testing of Spatial repellents. Control of neglected tropical diseases.** Who pesticide evaluation scheme. WHO/CDS/CPC/ MAL/13.12., Geneva, 58 pp, 2013.

Zara, A.L.D.S.A; Santos, S.M.D; Fernandes-Oliveira, E.S; Carvalho, R.G; Coelho, G.E. **Estratégias de controle do Aedes aegypti: uma revisão.** Epidemiol Serv Saúde. 25(2): 391 – 404, 2016.

## COMPOSTOS BIOATIVOS E POTENCIAL NUTRACÊUTICO DO FRUTO DE BURITI (*Mauritia flexuosa* L) NA TERAPIA COADJUVANTE EM PORTADORES DE DISLIPIDEMIA

### **Joilane Alves Pereira-Freire**

Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Piauí, Picos - Piauí

### **Vivianne Rodrigues Amorim**

Departamento de Biofísica e Fisiologia, Laboratório de Cancerologia Experimental, Universidade Federal do Piauí, Teresina - Piauí

### **Fernanda Maria de Carvalho Ribeiro**

Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Piauí, Picos – Piauí

### **Stella Regina Arcanjo Medeiros**

Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Piauí, Picos - Piauí

### **Jurandy do Nascimento Silva**

, Laboratório de Cancerologia Experimental, Universidade Federal do Piauí, Teresina - Piauí

### **Paulo Michel Pinheiro Ferreira**

Departamento de Biofísica e Fisiologia, Laboratório de Cancerologia Experimental, Universidade Federal do Piauí, Teresina - Piauí

**RESUMO:** Em decorrência das mudanças no estilo de vida do brasileiro, com aumento do sedentarismo e hábitos alimentares inadequados, além de outros fatores genéticos e ambientais, é possível perceber um relevante crescimento de dislipidemias na população, desde idades cada vez mais precoces. As dislipidemias são conhecidas como distúrbios nos níveis dos lipídeos e/ou lipoproteínas

e caracterizadas por níveis elevados de colesterol e triglicérides. O tratamento para dislipidemias deve ser medicamentoso com associação de mudanças na dieta habitual e o acréscimo de suplementação alimentar. Diante disso, os compostos nutracêuticos, despontam como uma alternativa para o tratamento de doenças crônicas. Dentre as plantas do bioma nordestino tem-se o buriti (*M. flexuosa*), rico em substâncias bioativas como compostos fenólicos, flavonoides, ácido ascórbico e beta caroteno e com grande potencial nutracêutico em terapia coadjuvante em portadores de dislipidemia. O presente trabalho analisa partes de subprodutos do fruto de *M. flexuosa* que conseguiram reduzir de maneira significativa os níveis de triglicerídeos e colesterol total quando avaliada em tratamento subagudo de 28 dias consecutivos com administração oral de casca (epicarpo), polpa (mesocarpo) e endocarpo do buriti.

**PALAVRAS-CHAVE:** Compostos bioativos. Bioma nordestino. Potencial nutracêutico. Dislipidemias

**ABSTRACT:** As a result of changes in the Brazilian lifestyle, with an increase in sedentary lifestyle and inadequate eating habits, in addition to other genetic and environmental factors, it is possible to perceive a significant growth of dyslipidemias in the population, from

earlier ages. Dyslipidemias are known as disorders of lipid and / or lipoprotein levels and characterized by elevated levels of cholesterol and triglycerides. The treatment for dyslipidemias should be medicated with an association of changes in the usual diet and the addition of food supplementation. Therefore, nutraceutical compounds appear as an alternative for the treatment of chronic diseases. Among the Brazilian native plants are buriti (*M. flexuosa*), rich in bioactive substances such as phenolic compounds, flavonoids, ascorbic acid and beta carotenes and with great nutraceutical potential in adjuvant therapy in patients with dyslipidemia. The present study shows results in which parts of *M. flexuosa* fruit by-products were able to significantly reduce triglyceride and total cholesterol levels when evaluated in 28 consecutive days subacute treatment with oral administration of peel (epicarp), pulp (mesocarp) and endocarp of the fruit of *M. flexuosa*, buriti.

**KEYWORDS:** Bioactive compounds. Buriti palm. Nutraceutical Potential. Dyslipidemias

## 1 | INTRODUÇÃO

Em decorrência do estilo de vida atual, que inclui estresse, sedentarismo, tabagismo, alcoolismo, uso de contraceptivos orais, bem como alterações no comportamento alimentar, os quais são influenciados pela cultura, sazonalidade, condições socioeconômicas, entre outros fatores, o homem fica exposto a uma gama de riscos para doenças da modernidade que por sua vez são um grande desafio da epidemiologia nutricional (VOLP et al, 2009).

Segundo a OMS (2013), mais de 20 milhões de pessoas morrerão por doenças cardiovasculares em 2030. Dados descritos pelo Data SUS afirmavam que no Brasil, as doenças do aparelho circulatório foram responsáveis pela segunda maior taxa de mortalidade, a partir de internações pelo SUS, em 2012.

As dislipidemias são doenças crônicas que podem impactar o risco cardiovascular e a sua associação com a doença aterosclerótica é amplamente aceita pela comunidade científica (XAVIER et al, 2013).

As dislipidemias são conhecidas como distúrbios nos níveis dos lipídeos e/ou lipoproteínas no sangue e, são caracterizadas por índices altos de colesterol e triglicérides. Estes distúrbios são causados por alterações metabólicas resultados de maus hábitos alimentares, associados com fatores genéticos e falta de atividade física (SANTOS; CARDOSO; AMARAL, 2014).

Alterações no lipidograma podem sinalizar para ocorrência das dislipidemias, que podem ser classificadas como hipercolesterolemia isolada (elevação de LDL); hipertrigliceridemia isolada (elevação de TG); hiperlipidemia mista (elevação de colesterol e TG) e diminuição isolada do HDL colesterol (XAVIER et al., 2013). O tratamento para dislipidemias pode ser através de medicamentos em casos mais graves e através de medidas não medicamentosas, principalmente com a mudança na alimentação e se possível com suplementação alimentar (ABADI E BUDEL,

2014), com isso, há um importante aumento da produção de alimentos específicos, visando a promoção, prevenção e manutenção da saúde. Baseados neste conceito de alimentação saudável surgiram os compostos nutracêuticos (VANENZUELA et al., 2014).

Diversas nomenclaturas e alegações têm confundido os consumidores sobre as diferenças entre nutracêuticos e alimentos funcionais, no entanto é bom se esclarecer que os nutracêuticos geralmente são apresentados em formulações farmacêuticas (ex: cápsulas), enquanto alimentos funcionais são os alimentos in natura, ou seja, o alimento em si, pronto para o consumo (ex: acerola rica em vitamina C) (GOMES et al, 2017).

Estudos clínicos desenvolvidos pela *European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation* em pacientes que apresentam hipercolesterolemia, demonstraram que o uso de nutracêuticos foi eficaz na redução do perfil lipídico plasmático (EUROPEAN, 2011); corroborando com esta afirmação CICERO (2016) e KARL et al (2012) afirmam que uso dos nutracêuticos são ferramentas eficazes para melhorar o perfil lipídico e contribuir com a prevenção de doenças cardiovasculares.

Dentre as plantas nativas de solo brasileiro tem-se a *Mauritia flexuosa* também conhecida como buriti, coqueiro-buriti, miriti, muriti, muritim, palmeira-dos-brejos, carandá-guaçu e carnadaí-guaçu, é uma palmeira da família Palmae, que vegeta as regiões alagadas e úmidas do Centro-Oeste, Norte e Nordeste do Brasil (BATISTA et al, 2011).

O buriti tem demonstrado elevado potencial nutricional e econômico com base no desenvolvimento de biotecnologia sustentável e utilização de recursos naturais, no entanto, na indústria alimentícia brasileira, a casca e o endocarpo são comumente descartados ou subutilizados, em detrimento da utilização da polpa no preparo de doces, sorvetes, sucos, compotas e mingaus, além da extração do óleo (CHAVES et al., 2015). Além disso, alguns estudos enfatizam as potencialidades farmacológicas de partes da *M. flexuosa*, como antimicrobianos (SIQUEIRA et al., 2014), antitumorais (SIQUEIRA et al., 2014), hipolipemiantes (AQUINO et al., 2016), hipoglicemiantes (BATAGLION et al., 2014) e com ação de cicatrização (BATISTA et al., 2012). Assim o presente trabalho busca expor os compostos biologicamente ativos do buriti (*Mauritia flexuosa* L) e com base nesses dados propor um fruto com potencial nutracêutico em terapia coadjuvante em portadores de dislipidemia.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Produção das farinhas liofilizadas a partir dos subprodutos de buriti

Foram coletados 300 frutos de buriti (*Mauritia flexuosa* L.) na cidade de Água Branca, município do estado do Piauí, esses frutos foram selecionados quanto à

sanidade e um mesmo estágio de maturação, em seguida, higienizados em água corrente contendo 25 ppm de hipoclorito de sódio comercial. Posteriormente, a polpa (PL), casca (CL) e o endocarpo (EL), foram liofilizados e analisados após esse processo, conforme metodologia descrita em PEREIRA-FREIRE et al., 2018 (Figura 1).

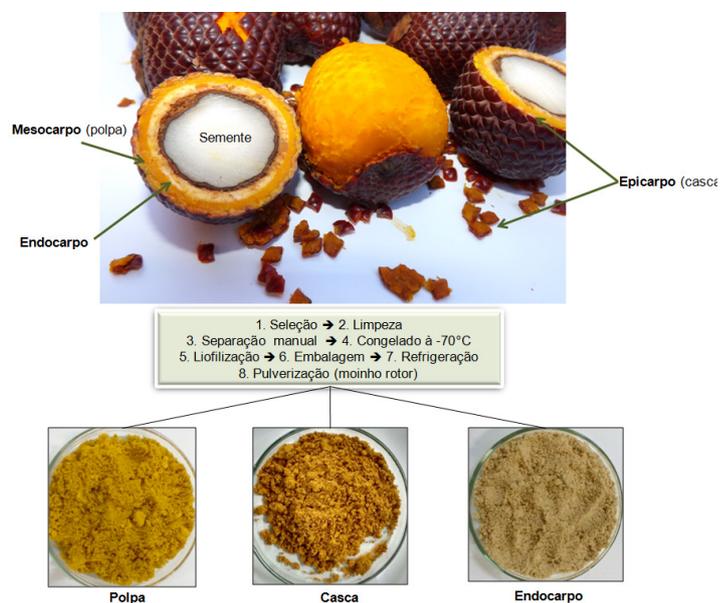


FIGURA 1. Processamento das farinhas a partir dos frutos de *M. flexuosa*

As amostras liofilizadas foram acondicionadas em embalagens plásticas e sob refrigeração, para em seguida serem processadas (pulverização) em moinho de rotor tipo ciclone (TE-651/2-TECNAL) até a obtenção de um pó homogêneo (0,5 mesh) – Figura 1.

## 2.2 Toxicidade subaguda com avaliação do perfil lipídico

### 2.2.1 Preparo do extrato aquoso e metanólico

As três amostras do fruto de buriti, após o processo de desidratação por liofilização e processamento em moinho rotor até a obtenção de um pó homogêneo (0,5 mesh), foram posteriormente submetidas à extração com solução aquosa e metanólica por maceração em gral de pistilo durante 10 minutos (1/10, amostra/solvente) até obter uma consistência uniforme. Em seguida, foi realizado o armazenamento dos extratos metanólico e aquoso em 4 °C por até 2 dias para procedimento das análises de quantificação dos compostos bioativos (fenóis, flavonoides, ácido ascórbico, carotenoides e taninos) e o estudo de toxicidade subaguda foi desenvolvido com o extrato aquoso, preparado a cada 2 dias.

## 2.2.2 Compostos Bioativos

Realizou-se a determinação de fenóis, flavonoides, carotenoides e taninos condensados e hidrolisáveis, bem como a caracterização fitoquímica por CLAE / HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para análise qualitativa, segundo metodologia descrita em PEREIRA-FREIRE *et al.*, 2018.

## 2.2.3 Toxicidade e análise bioquímica

Nesse protocolo foram utilizados 7 camundongos por grupo, sendo todos fêmeas da linhagem *Swiss*, nulíparas, não grávidas, saudáveis, com 3 meses de idade e média de  $30,0 \pm 0,10$  g, todos provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí. Foram administradas as doses de 300 e 600 mg/kg de cada amostra (polpa, casca e endocarpo) além do grupo veículo (água, v.o. 1mL/100g). A administração foi realizada por via oral durante 28 dias consecutivos, sempre no mesmo horário, respeitando o ciclo claro/escuro. Após os 28 dias foram feitas as análises bioquímicas. O protocolo completo e metodologias estão descritas no trabalho original de PEREIRA-FREIRE *et al.*, 2018.

# 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1 Compostos bioativos

Os resultados da triagem dos compostos bioativos (CB) de partes do fruto de buriti estão descritos na Tabela 1. A casca foi a amostra que apresentou maiores valores para fenóis, flavonoides, carotenoides e taninos, quando comparado com a polpa e o endocarpo ( $p < 0,05$ ). E na polpa, houve predominância de todos os CB avaliados em relação ao EL ( $p < 0,05$ ).

Classe dos compostos *	Polpa	Casca	Endocarpo
<b>Fenóis totais</b> (mg EAG/100 g AM)	$553,5 \pm 7,7^b$	$1288,0 \pm 10,4^{a,c}$	$597,1 \pm 6,5^b$
<b>Flavonoides totais</b> (mg EQE/100 g AM)	$264,4 \pm 2,1^{b,c}$	$339,4 \pm 3,9^{a,c}$	$145,4 \pm 10,2^{a,b}$
<b>Carotenoides totais</b> (mg $\beta$ CTE/100 g AM)	$58,9 \pm 0,1^{b,c}$	$88,3 \pm 0,3^{a,c}$	$19,1 \pm 0,2^{a,b}$
<b>Taninos hidrolisáveis</b> (mg ACT/100g AM)	$47,4 \pm 0,3^{b,c}$	$56,1 \pm 0,4^{a,c}$	$0,1 \pm 0,0^{a,b}$
<b>Taninos condensados</b> (mg CTQ/100g AM)	$69,6 \pm 1,8^{b,c}$	$118,3 \pm 2,1^{a,c}$	$36,5 \pm 1,2^{a,b}$

Tabela 1 - Quantificação (mg/100g amostra) de fenóis, flavonoides, carotenoides, taninos condensados e hidrolisados em extratos metanólicos de polpa, casca e endocarpo liofilizados de buriti.

Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. <sup>a</sup> $p < 0,05$  em relação à polpa (0,5 mg/mL). <sup>b</sup> $p < 0,05$  em relação à casca (0,5 mg/mL). <sup>c</sup> $p < 0,05$  em relação ao endocarpo (0,5 mg/mL) (ANOVA e *Neuman-Keuls* como post hoc teste).

A casca liofilizada do fruto apresentou os maiores valores para todos os compostos bioativos, quando comparada com as demais amostras (Tabela 1). Em todas as partes da planta, existe a presença de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, ácido ascórbico e beta caroteno.

De fato, estudos anteriores demonstraram que extratos de polpa de Buriti da região amazônica têm principalmente ácido quínico, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, p-Cumárico, protocatecúico, catequina, epicatequina, luteolina, apigenina, miricetina, canferol e quercetina, alguns deles são encontrados também em concentrações mais baixas (BATAGLION et al., 2014). A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) também demonstra que o buriti é uma excelente fonte de carotenóides (44600 µg / 100 g), especialmente  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno e cis- e trans- $\gamma$ -caroteno, que normalmente são encontrados em cenouras, fonte de vitamina A mais conhecida e aceita pelos consumidores, justificando seu uso no tratamento de hipovitaminose A (LIMA et al., 2009; SANTOS et al., 2015, AQUINO et al. 2015).

Os resultados do *screening* fitoquímico apresentaram diferenças por 100g de material seco, considerando que as amostras de buriti da atual pesquisa foram coletadas em condições naturais do Cerrado brasileiro (um tipo de savana). Porém, a maioria dos estudos revisados apresentou resultados com frutos da região amazônica. Essas diferenças podem ser explicadas por variações nas condições do bioma, já que a Amazônia é quente e úmida, enquanto o Cerrado apresenta um clima mais seco. Além disso, o Cerrado é mais ácido e rico em sais de alumínio, o que provavelmente irá gerar maior estresse oxidativo para as plantas que reagem produzindo agentes antioxidantes (CÂNDIDO, SILVA, AGOSTINI-COSTA, 2015).

De um modo geral, os antioxidantes estão presentes em pequenas quantidades nos alimentos e nas plantas. A busca por novos compostos antioxidantes é o foco principal de muitas pesquisas devido à participação dos radicais livres no surgimento e progresso de doenças crônicas e, sobretudo, ao aumento da expectativa de vida populacional.

### 3.2 Caracterização fitoquímica por HPLC das amostras de buriti

Os resultados da caracterização fitoquímica de extratos metanólicos de polpa, casca e endocarpo de buriti, identificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, descritos nos cromatogramas das Figuras 2 (A, B e C) e Tabela 2. Os cromatogramas foram obtidos no comprimento de onda de detecção de 230 nm, visto que, nele os compostos fenólicos apresentam os máximos de absorção, além da obtenção de melhores perfis cromatográficos.

A correlação dos picos cromatográficos foi obtida pela comparação dos tempos de retenção (tR) com padrões de referência. Todas as análises cromatográficas foram realizadas em triplicata e revelaram compostos fenólicos (ácido protocatecúico, quercetina, apigenina, catequina e epicatequina) com os seguintes tR: 16,3, 33,6, 41,7, 53,6 e 49,3 minutos, respectivamente (Tabela 2).

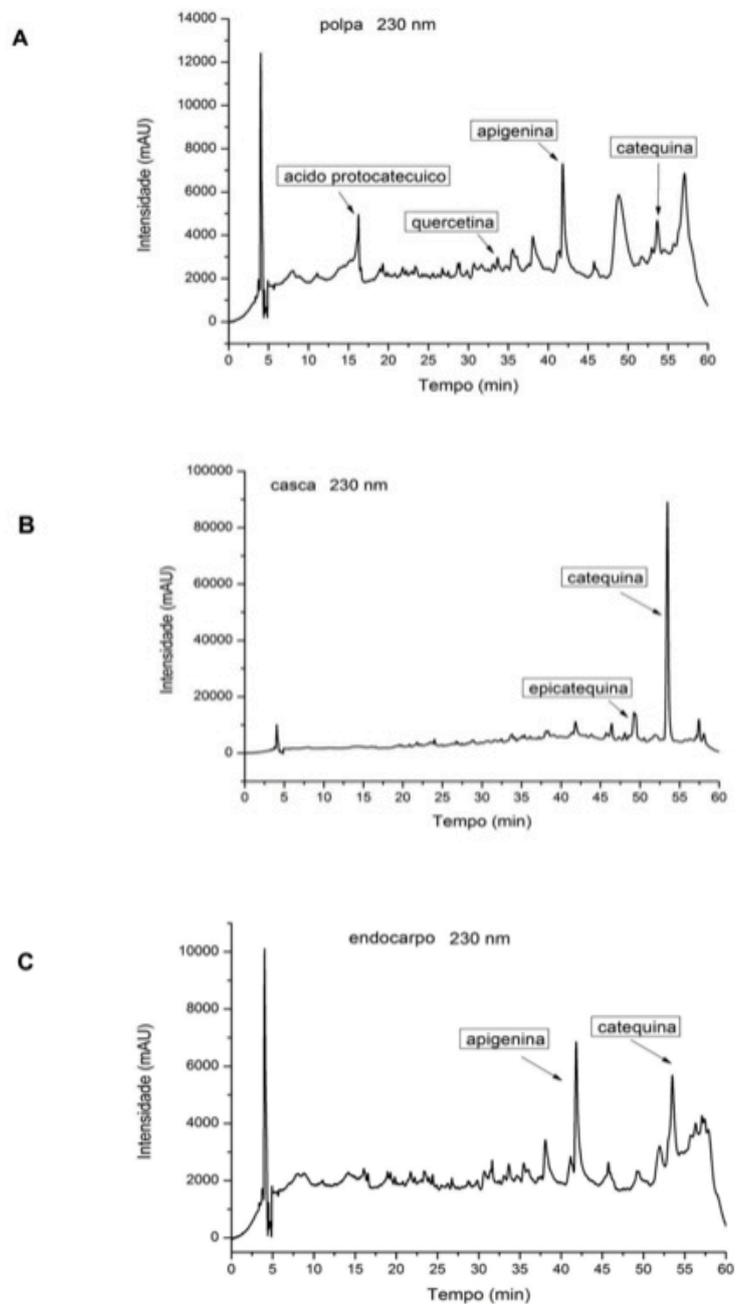


Figura 2 - Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD para (A) extrato metanólico de polpa, (B) casca e (C) endocarpo (230 nm).

Nome IUPAC	Estrutura química	Classe	Tempo de Retenção (min)	Amostra
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico (ácido protocatecuico)		Fenol	16,3	Polpa
2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxichromen-4-ona ( <i>quercetina</i> )		Flavonoide	33,6	Polpa

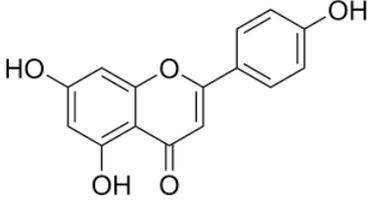
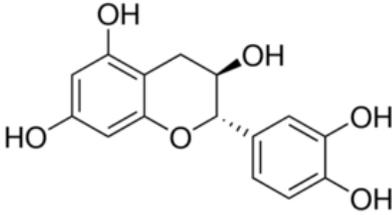
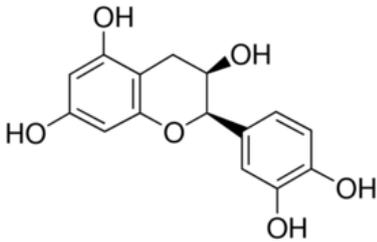
4',5,7-trihidroxi-flavona (apigenina)		Flavonoide	41,7	Polpa Endocarpo
(-)-trans-3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona, (2S,3R)-2-(3,4-dihidroxi-fenil)-3,4-dihidro-1(2H)-benzopiran-3,5,7-triol (catequina)		Tanino Condensado	53,6	Endocarpo Casca Polpa
(-)-cis-3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona, (2R,3R)-2-(3,4-dihidroxi-fenil)-3,4-dihidro-1(2H)-benzopiran-3,5,7-triol (epicatequina)		Tanino condensado	48,3	Casca

Tabela 2 – Identificação de compostos por HPLC em amostras de partes do fruto de buriti.

Pesquisas recentes afirmam que os compostos fenólicos tem a capacidade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e cardioprotetora; seu estudo é importante porque seus subprodutos são de interesse para as indústrias de alimentos, nutracêutica, farmacêutica e química, principalmente devido à possibilidade de aproveitar os resíduos, ricos em compostos fenólicos, para produção de extratos e novos produtos de manutenção da saúde humana. A extração desses compostos de materiais derivados das práticas industriais representa uma alternativa atrativa, sustentável e de baixo custo para obter bioativos com alto valor biológico, os quais podem ser incorporados em alimentos (JARA-PALACIOS et al., 2015).

Os flavonoides são substâncias importantes devido às suas diversas atividades sobre os vários sistemas biológicos, em especial, sobre o sistema cardiovascular (SILVA et al, 2015). Os flavonoides se apresentam como uma fonte promissora no desenvolvimento de medicamentos para o tratamento da Doença de Alzheimer e outras doenças crônico-degenerativas não transmissíveis como dislipidemia entre outras doenças, devido ao seu largo espectro de atividades farmacológicas, principalmente pela capacidade de se ligar aos polímeros biológicos (enzimas, hormônios e DNA), bem como agir como quelantes de íons metálicos ( $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ), catalisando transporte eletrônico e impedindo a formação de radicais livres, além da baixa toxicidade (NASCIMENTO et al, 2015).

Por fim os resultados demonstram por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) que o buriti é uma excelente fonte de beta caroteno (44600  $\mu g/100g$ ), destes 70% são de  $\beta$ -caroteno, 12% de  $\alpha$ -caroteno e 1,6% de luteína, estando acima dos teores normalmente encontrados em cenoura, uma fonte muito conhecida e aceita

pelos consumidores, tais dados justificam a utilização do fruto de buriti no combate à hipovitaminose A (AQUINO et al., 2015).

Nos últimos anos, o mercado brasileiro de produtos naturais está em franca expansão, acompanhando uma tendência mundial e isso se deve ao argumento de que as plantas e compostos naturais são eficazes, seguros e isentos de efeitos adversos, além de apresentarem atividade terapêutica específica (RECKZIEGEL et al., 2011). Entretanto, em sua maioria, essas indicações terapêuticas possuem fundamentação apenas em hábitos e costumes populares, sem comprovação farmacológica ou mesmo estudos de toxicidade pré-clínicos. Tais produtos naturais possuem uma ampla variabilidade de constituintes químicos e isso reflete em diferentes mecanismos biológicos, farmacológicos e toxicológicos, assim como interfere também sobre sua eficácia e segurança.

Parâmetros	Perfil bioquímico						
	Controle negativo	Polpa		Casca		Endocarpo	
		300 mg/kg	600 mg/kg	300 mg/kg	600 mg/kg	300 mg/kg	600 mg/kg
Triglicerídeos (mg/dL)	149,20 ± 2,72	128,50 ± 0,43*	119,30 ± 0,67*	102,20 ± 2,87*	99,33 ± 2,58*	111,80 ± 1,30*	106,30 ± 0,67*
Colesterol Total (mg/dL)	104,90 ± 1,14	79,43 ± 3,36*	82,14 ± 4,58*	87,00 ± 2,01*	87,14 ± 1,62*	82,43 ± 4,52*	90,86 ± 1,97*
HDL (mg/dL)	49,50 ± 1,33	56,43 ± 3,10	54,67 ± 3,15	52,83 ± 2,60	62,33 ± 1,45*	52,83 ± 2,96	52,17 ± 1,70

TABELA 3. Perfil bioquímico de camundongos Swiss tratados via oral por gavagem com extratos da polpa, casca e endocarpo de *Mauritia flexuosa* em doses repetidas por 28 dias.

Os dados apresentados na tabela 3 fazem parte de um estudo mais completo de toxicidade subaguda desses subprodutos em que foi avaliado diversos parâmetros bioquímicos e hematológicos (PEREIRA-FREIE, 2017) e recorte desses dados estão aqui apresentados e sugerem que o buriti reduziu de forma significativa os níveis de triglicerídeos e colesterol total nas três partes da planta avaliadas e que também conseguiu elevar o HDL na casca na dose de 600 mg/Kg. É importante destacar que o protocolo desenvolvido nessa pesquisa, não foi específico para dislipidemias e sim um estudo de toxicidade dos subprodutos do fruto de buriti, porém evidenciou-se dados relevantes sobre o perfil lipídico desses animais durante o tratamento. Entretanto, mais pesquisas devem ser desenvolvidas para a compreensão e elucidação desses mecanismos de ação e propriedades farmacológicas do buriti.

Ainda assim, é necessário frisar que o consumo de alimentos ricos em fibras solúveis pode auxiliar na redução da glicemia e do colesterol (MUDGIL; BARAK, 2013), e os bioprodutos de buriti, especialmente a polpa, apresentaram quantidade relevante de fibras solúveis, o que proporciona viscosidade e capacidade para formar géis e/ou atuam como emulsionantes, melhorando o perfil glicídico e lipídico. Outros pontos importantes a ressaltar são:

a) Os ácidos graxos presentes no fruto que são tipicamente insaturados, os quais podem atuar favoravelmente na redução dos lipídios séricos (DARNET et al., 2011; AQUINO et al 2015, 2016);

b) Extratos de diferentes partes da *Mauritia flexuosa* (folha, caule e fruto) possuem quantidades significantes de compostos fenólicos, principalmente ácido clorogênico e o protocatecuico (KOOLEN et al., 2013). Ambos reduzem a síntese de ácidos graxos, por inibir a atividade da HMG-CoA redutase (3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase), sugerindo que eles possuem efeitos biológicos sobre o peso corporal, o metabolismo lipídico e níveis de hormônios relacionados à obesidade como leptina e adiponectina (CHO et al., 2010);

c) O ácido protocatecuico possui atividade hipoglicemiante e efeitos benéficos sobre o tecido adiposo, devido as suas propriedades anti-inflamatórias e sensibilidade à insulina, de modo que ele se revelou como protetor contra a resistência à insulina (BATAGLION et al., 2014, SCAZZOCCHIO et al., 2015). Este composto fenólico e muitos outros foram identificados nas amostras de polpa, casca e endocarpo de buriti, conforme resultados previamente descritos;

d) Ratos jovens alimentados de forma suplementar com óleo refinado de buriti mostraram redução do colesterol total, da lipopreína de baixa densidade (LDL), de triglicerídeos e da enzima aspartato transaminase em comparação àqueles alimentados com dieta adicionada de óleo cru. Algumas análises fitoquímicas demonstraram que em óleo cru extraído da *M. flexuosa* existe maiores concentrações de fitoesteróis, vitaminas, antioxidantes e pigmentos (AQUINO et al., 2015; MILANEZ et al., 2016), substâncias que estão frequentemente associadas à redução de colesterol sérico e do estresse oxidativo.

#### 4 | CONCLUSÃO

Com base nos dados expostos, as farinhas produzidas a partir de subprodutos do fruto buriti demonstraram potencial terapêutico com possível ação hipocolesterolêmica, abrindo possibilidades para estudos futuros que vislumbrem a elaboração de nutracêuticos com características hipolipemiantes e desse modo ser útil em terapia coadjuvante em portadores de dislipidemias, uma vez que os bioprodutos do buriti utilizados nessa pesquisa são ricos em compostos bioativos, frequentemente associados à redução de colesterol sérico e ao estresse oxidativo.

#### AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa foi parcialmente financiada pelo público brasileiro agência “Fundação do Amparo” a Pesquisa do Estado do Piauí [FAPEPI (concessão nº 004/2016)]. Os autores correspondentes são gratos a todos que contribuíram direta ou indiretamente .O coautor Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira também agradece

ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [CNPq (#305086/2016-2)] pelo reconhecimento científico na forma de bolsa de produtividade.

## REFERÊNCIAS

ABADI, L. B.; BUDEL, J. M. **Aspectos Clínicos laboratoriais das dislipidemias. Saúde**, v. 1, n. 5, 2014.

AQUINO, J.S.; SOARES, J.K.B.; MAGNANI, M.; STAMFORD, T.C.M.; MASCARENHAS, R.J.; TAVARES, R.L., STAMFORD T.L.M.Effects of dietary brazilian palm oil (*Mauritia flexuosa* L.) on cholesterol profile and vitamin A and E status of rats. **Molecules**, v. 20, p. 9054-9070, 2015.

AQUINO, J. S., VASCONCELOS, M. H. A., PESSOA, D. C. N. P., SOARES, J. K. B., PRADO, J. P. S., MASCARENHAS, R. J., MAGNANI, M., STAMFORD, T. L. M. Intake of cookies made with buriti oil (*Mauritia flexuosa*) improves vitamin A status and lipid profiles in young rats. **Food & Function: Royal Society of Chemistry**, p.1-9, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). DATASUS. Informações de Saúde. *Banco de dados do Sistema Único de Saúde-DATASUS* Brasília: MS; 2012. [acessado 2013 jul 7]. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>  
» <http://www.datasus.gov.br>

BATAGLION, G. A., SILVA, F. M. A., EBERLIN, M. N., KOOLEN, H. H. F. Simultaneous quantification of phenolic compounds in buriti fruit (*Mauritia flexuosa* L. f.) by ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Food Research International**, v. 66, p. 396-400, 2014.

BATISTA, J.S.; OLINDA, R. G; MEDEIROS, V. B.et al. Antibacterial and healing activities of buriti oil *Mauritia flexuosa* L. **Ciência Rural**, 2011.

BATISTA, J. S., OLINDA, R. G., MEDEIROS, V. B., RODRIGUES, C. M. F., OLIVEIRA, A. F., PAIVA, E. S., FREITAS, C. I. A., MEDEIROS A. D. C. (2012). Atividade antibacteriana e cicatrizante do óleo de buriti *Mauritia flexuosa* L. **Ciência Rural**, v. 42, p. 136-141, 2012.

CÂNDIDO, T.L.N.; SILVA, M.R.; AGOSTINI-COSTA, T.S. Bioactive compounds and antioxidant capacity of buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.) from the Cerrado and Amazon biomes. **Food Chemistry**, v. 177, p. 313–319, 2015.

CHAVES, T. L., RICARDO, L., DE PAULA-SOUZA, J., BRANDÃO, M. D. G. L. Useful Brazilian plants under the view of the writer-naturalist João Guimarães Rosa. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 25, p. 437-444, 2015.

CHO, A.S.; JEON, S.M.; KIM, M.J.; YEO, J.; SEO, K.L.; CHOI, M.S.; LEE, M.K Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. **Food Chemistry Toxicology**, v. 48, p. 937-43, 2010.

CICERO, A. F.; COLLETI, A.; ROSTICCI, M. GRANDI, E.; BORGHI, C. Efficacy and tolerability of a combined lipid-lowering nutraceutical on cholesterolemia, hs-CRP level and endotelial function in moderately hypercholesteromic subjects. **J Biol Regul Homeost Agents**, v.30, n.2, p.593-598, 2016.

DARNET, S.H.; SILVA, L.H.M.; RODRIGUES, A.M.C.; LINS, R.T. Nutritional composition, fatty acid and tocopherol contents of buriti (*Mauritia flexuosa* L.) and patawa (*Oenocarpus bataua*) fruit pulp from the Amazon region. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.3, p.488-91, 2011.

European Association for Cardiovascular P, Rehabilitation. REINER, Z.; CATAPANO, A.L.; DE

- BACKER, G.; GRAHAM, I. et al. ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS) *Eur Heart J.v.* 32, n.14, p.1769-1818, 2011.
- GOMES, A. S.; MAGNUS, K.; DE SOUZA, A. H. Riscos e benefícios do uso de nutracêuticos para a promoção da saúde. **Revista Saúde e Desenvolvimento.** v.11, n.9, 2017.
- JARA-PALACIOS, M. J. et al. Assessment of white grape pomace from winemaking as source of bioactive compounds, and its antiproliferative activity. **Food Chemistry**, v. 183, p. 78-82, 2015.
- KARL, M.; RUBENSTEIN, M.; RUDNICK, C.; BREJDA, J. A multicenter study of nutraceutical drinks for cholesterol (evaluating effectiveness and tolerability). **Epub.** v. 6, n.2, p.150-158, 2012.
- KOOLEN, H. H., DA SILVA, F. M., GOZZO, F. C., DE SOUZA, A. Q., DE SOUZA, A. D. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC–ESI-MS/MS. **Food Research International**; v. 51, p. 467-473, 2013.
- LIMA, A.L.; LIMA, K.S.; COELHO, M.J.; SILVA, J.M.; GODOY, R.L.; PACHECO, S. Evaluation of gamma irradiation effects on carotenoids, ascorbic acid and sugar contents of buriti fruit (*Mauritia flexuosa* L.). **Acta Amazônica**, v. 39, p. 649 – 54, 2009.
- MANHÃES, L.; MENEZES, E.; MARQUES, A.; SABAA-SRUR, A. Flavored Buriti Oil (*Mauritia flexuosa*, Mart.) for Culinary Usage: Innovation, Production and Nutrition Value. **Journal of Culinary Science and Technology**, v. 13, p. 362-74, 2015.
- MEDEIROS, M.C.; AQUINO, J.S.; SOARES, J.; FIGUEIROA, E.S.; MESQUITA, H.M.; PESSOA, D.C.; STAMFORD, T.M. Buriti oil (*Mauritia flexuosa* L.) negatively impacts somatic growth and reflex maturation and increases retinol deposition in young rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 46, p. 7–13, 2015.
- MILANEZ J.T.; NEVES, L.C.; da SILVA, P.M.C.; BASTOS, V.J.; SHAHAB, M.; COLOMBO, R.C.; ROBERTO, S.R. Pre-harvest studies of buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.), a Brazilian native fruit, for the characterization of ideal harvest point and ripening stages. **Scientia Horticulturae**, v. 202, p. 77–82, 2016.
- MUDGIL, D.; BARAK, S. Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: A review. **International Journal of Biogical Macromolecules**, v. 61, p.1–6, 2013.
- NASCIMENTO, R. R. G.; MONTEIRO, J. A.; PIMENTA, A. T. A.; TREVISAN, M. T. S. et al. Novos flavonoides de *margaritopsis carrascoana* com atividade antioxidante. **Quim. Nova**, v. 38, n. 1, p. 60-65, 2015.
- OLIVEIRA, D.M.; SIQUEIRA, E.P.; NUNES, Y.R.; COTA, B.B. Flavonoids from leaves of *Mauritia flexuosa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, p. 614-20, 2013.
- PEREIRA-FREIRE, J.A.; OLIVEIRA, G. L. S.; LIMA, L. K. F. *In Vitro* and *Ex Vivo* Chemopreventive Action of *Mauritia flexuosa* Products. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, Article ID 2051279, p.1- 12, 2018.
- PEREIRA-FREIRE, J. A., Barros, K. B. N. T.; Lima, L. K. F. et al., “Phytochemistry profile, nutritional properties and pharmacological activities of *Mauritia flexuosa*,” **Journal of Food Science**, v. 81, p. 2611–2622, 2016.
- SANTOS; CARDOSO; AMARAL, 2014 - SANTOS E. M. F.; CARDOSO, G.; AMARAL, G. A. DISLIPIDEMIA NA ADOLESCÊNCIA. **Revista Eletrônica Interdisciplinar**, v. 2, n. 12. ISSN 1984-431X. 2014.

SCAZZOCCHIO, B.; VARI, R.; FILESI, C.; DEL GAUDIO, I.; D'ARCHIVIO, M.; SANTANGELO, C.; IACOVELLI, A.; GALVANO, F.; PLUCHINOTTA, F.R.; GIOVANNINI, C.; MASELLA, R. Protocatechuic acid activates key components of insulin signaling pathway mimicking insulin activity. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 59, p.1472–81, 2015.

SPERANZA, P.; RIBEIRO, A.P.B.; MACEDO, G.A. Application of lipases to regiospecific interesterification of exotic oils from an Amazonian area. **Journal of Biotechnology**, v. 218, p.13–20, 2016.

SILVA, J. C. B.; KAMADA, T.; FERREIRA, F. P.S.; SIMON, G. A. Efeito da adubação no teor de flavonoides totais e caracteres agronômicos do mentrasto. **REVISTA ONLINE Universidade de Rio Verde**, ano 1, n. 1, Janeiro/2015.

SIQUEIRA, E. P., ANDRADE, A. A., SOUZA-FAGUNDES, E. M., RAMOS, J. P., KOHLHOFF, M., NUNES, Y. R., COTA, B. B. *In vitro* antibacterial action on methicillin susceptible (MSSA) and methicillin-resistant (MRSA) *Staphylococcus aureus* and antitumor potential of *Mauritia flexuosa* L. f. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 8, p. 1408-1417, 2014.

SOUZA, C. A. G. DE, SIQUEIRA, S. M. C.; AMORIM A. F. V. DE. et al. Encapsulação do ácido l-ascórbico no biopolímero natural galactomanana por *spray-drying*: preparação, caracterização e atividade antioxidante. **Quim. Nova**, v. 38, n. 7, p. 877-883, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Cardiovascular diseases* 2013. [acessado 2013 jun 10]. Disponível em: [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/en/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/).

VANENZUELA, A. B. et al. Alimentos funcionales, nutraceúticos y foshu: vamos hacia un nuevo concepto de alimentación? **Revista chilena de nutrición**, v. 41, n. 2, p. 511-518, 2014.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. PIGMENTOS NATURAIS BIOATIVOS. **Alim. Nutr. Araraquara** v.20, n.1, p. 157-166, 2009. XAVIER, H.T.; IZAR, M. C.; FARIA NETO, J.R.; ASSAD, M.H.; ROCHA, V.Z.; SPOSITO, A.C.; FONSECA, F.A.; DOS SANTOS, J.E. et al. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arq Bras Cardiol*, v. 101, n. 4 Supl. 1, p.1-20, 2013.

## DESENVOLVIMENTO DE MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO PARA IMOBILIZAÇÃO DE *Chlorella vulgaris*

### Felipe de Albuquerque Santos

Universidade Tecnológica Federal do Paraná,  
Ponta Grossa – Paraná

### Eduardo Bittencourt Sydney

Universidade Tecnológica Federal do Paraná,  
Ponta Grossa – Paraná

### Alessandra Cristine Novak Sydney

Universidade Tecnológica Federal do Paraná,  
Ponta Grossa – Paraná

**RESUMO:** A microalga *Chlorella vulgaris* é amplamente estudada e comercializada. Os custos de produção de microalgas devem ser continuamente reduzidos, visando aumentar a sua competitividade. O objetivo do presente estudo foi analisar a viabilidade de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*, aspirando diminuir os custos com a recuperação das suas células, que poderiam ser simplesmente filtradas ao invés de centrifugadas (método convencional). Uma das alternativas para recuperação das células é o método de imobilização celular. Dentre os métodos de imobilização, o método de gelificação iônica é baseado no gotejamento de alginato de sódio sobre solução de cloreto de cálcio, formando alginato de cálcio, que produz uma estrutura em rede tridimensional. A estabilidade, rigidez e esfericidade adequadas das partículas são condições fundamentais para o fluxo de nutrientes entre o meio e as células.

O procedimento foi realizado em fluxo laminar com uma bomba peristáltica a 31 rpm, com saída da solução para gotejamento por ponteira de micropipeta de 200 $\mu$ L, inclinada 45° sobre a solução de cloreto de cálcio 125mM, e fluxo de ar proveniente do biorreator com vazão de 10L. min<sup>-1</sup>. Depois de encapsuladas, as partículas obtidas foram colocadas em frasco Erlenmeyer contendo meio de cultivo (MBM – Meio Bristol modificado), e outro frasco, contendo apenas células livres e meio de cultivo, foi utilizado como controle. Os cultivos foram mantidos a 25°C, em fotoperíodo 12h:12h durante 7 dias. O desenvolvimento de micropartículas para imobilização de *Chlorella vulgaris* possibilita estudos sobre a aplicação da mesma no tratamento de resíduos, suplementação alimentar e produção de energia.

**PALAVRAS-CHAVE:** Imobilização, *Chlorella vulgaris*, Downstream.

**ABSTRACT:** The microalgae *Chlorella vulgaris* is widely studied and commercialized. The costs of producing microalgae should be continuously reduced in order to increase their competitiveness. The objective of the present study was to analyse the viability of growth of the microalga *Chlorella vulgaris*, in order to reduce the costs of recovering its cells, which could be simply filtered instead of centrifuged (conventional method). One of the alternatives

for cell recovery is the cell immobilization method. Among the immobilization methods, the ionic gelling method is based on the drip of sodium alginate on calcium chloride solution, forming calcium alginate, which produces a three-dimensional network structure. Suitable stability, stiffness and sphericity of the particles are fundamental conditions for the flow of nutrients between the medium and the cells. The procedure was carried out in laminar flow with a peristaltic pump at 31 rpm, with solution outlet for dripping by a micropipette tip of 200 $\mu$ L, inclined 45° on the solution of calcium chloride 125mM, and air flow from the bioreactor at 10 L.min<sup>-1</sup>. After encapsulation, the obtained particles were placed in a flask containing culture medium (MBM), and another flask, containing only free cells and culture medium, was used as a control. Cultures were maintained at 25°C, in photoperiod 12h: 12h for 7 days. The development of microparticles for immobilization of *Chlorella vulgaris* enables studies on its application in waste treatment, food supplementation and energy production.

**KEYWORDS:** Immobilization, *Chlorella vulgaris*, Downstream.

## 1 | INTRODUÇÃO

A biotecnologia consiste em um vasto campo que estuda a utilização de sistemas e constituintes celulares para serem aplicados na indústria e, posteriormente, em produtos do cotidiano das pessoas. Dessa maneira, torna-se um ramo essencial no desenvolvimento econômico<sup>1</sup>.

Acada dia que passa, aumenta-se a necessidade do uso de ativos biotecnológicos para diversos fins, seja para tratamento de efluentes, fixação de CO<sub>2</sub> proveniente de termoeletricas, produção de biocombustíveis, suplementos nutritivos, utilização de microrganismos geneticamente modificados, dentre outros. Porém, esses ativos são muitas vezes perdidos durante os processos, ou então têm baixo reaproveitamento devido às dificuldades de se trabalhar com os microrganismos livres. Devido a esse fato, busca-se novos meios de reutilizar os ativos biotecnológicos e, por isso, é necessário desenvolver e aplicar técnicas eficazes de reaproveitamento desses ativos, sem que haja danos aos mesmos.

Dentre os ativos biotecnológicos em evidência atualmente, encontra-se a microalga *Chlorella vulgaris*. Possui alto potencial econômico, pois é utilizada para produção de suplementos alimentares ricos em ferro e no tratamento de resíduos abundantes em nitrogênio e fósforo. Particularmente, a *Chlorella vulgaris* é uma espécie unicelular de água doce pertencente à classe *Chlorophyceae*, ordem *Chlorococcales* e família *Oocystaceae*. Pode acumular pigmentos como clorofila a e b,  $\beta$ -caroteno e xantofilas<sup>2</sup>. Visto que a microalga em estudo é amplamente comercializada, um dos grandes desafios é reduzir os custos de sua obtenção para aumentar sua competitividade no mercado.

O método tradicional de obtenção *Chlorella vulgaris* é por meio da centrifugação. Entretanto, esse é um método relativamente dispendioso. Além disso, apresenta

reaproveitamento baixo, pois há perda de biomassa durante o processo.

Um dos meios alternativos de obtenção e reaproveitamento da *Chlorella vulgaris* é através da imobilização celular. O processo de imobilização é caracterizado pela restrição da mobilidade do ativo em um espaço confinado, suportando assim altas concentrações celulares, implicando em maiores velocidades de processamento <sup>3</sup>. Algumas vantagens da imobilização celular são a eliminação do uso de métodos de ciclos externos para obtenção do ativo, possibilitando, por exemplo, ciclos simples como a filtração. Além disso, há maior proteção das células de estresse ambiental, como altas concentrações de pH, substrato e cisalhamento <sup>4</sup>. A imobilização de células consiste no contato entre o material imobilizador e as células vivas, sob condições controladas. Existem basicamente três métodos de imobilização celular: adsorção, ligação covalente e envolvimento.

Devido ao baixo custo e menor complexidade, o método de imobilização mais utilizado é por envolvimento. Este método fundamenta-se no princípio de gotejamento de uma solução polimérica acrescida de células vivas sobre uma solução de  $\text{CaCl}_2$  <sup>4</sup>.

Dentre as soluções poliméricas, também chamadas de suporte, encontra-se o alginato. O alginato é um polímero natural e, atualmente, um dos mais utilizados para encapsulamento de células vivas. Não possui toxicidade, é biocompatível e apresenta elevada resistência mecânica <sup>5</sup>. O alginato comercial é extraído de algas marrons, principalmente de diferentes espécies do gênero *Laminaria* (*L. hyperborea*, *L. digitata*, *L. japonica*) e do gênero *Sargassum* (*Macrocystis pyrifera*, *Ascophillum nodosum*, *Lesonia negrescens*). O alginato de sódio é um polímero linear composto por ácido  $\beta$ -D-manurônico (M) e ácido  $\alpha$ -L-gulorônico (G). M e G são as unidades monoméricas. Os monômeros se agrupam em séries de MM, GG e MG <sup>6</sup>.

Quando a solução de alginato contendo células de *Chlorella vulgaris* cai sobre a solução de  $\text{CaCl}_2$ , formam-se gotas insolúveis em água e de alta viscosidade. Apesar disso, as condições de sobrevivência do ativo imobilizado são mantidas, visto que há o fluxo de substâncias e a conservação metabólica <sup>7</sup>.

Quando as estruturas gulorônicas reagem com íons  $\text{Ca}^{2+}$ , forma-se uma espécie de caixa de ovos. Essa espécie de “egg-box” foi assim denominada por Grant, seu descobridor <sup>8</sup>. O alginato modifica sua forma linear ao reagir com íons cálcio divalentes, gerando uma rede tridimensional, ampliando a possibilidade de mais íons cálcio reagirem com o alginato, formando estruturas cada vez mais complexas, assim como representado na figura 1.

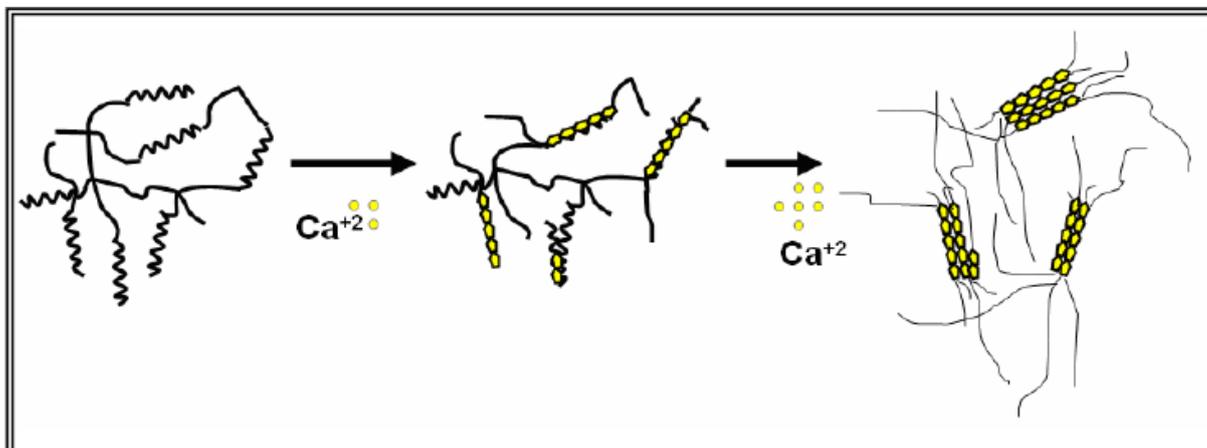


Figura 1. Modelo “egg-box” do alginato.

Fonte: Bressel, 2007.

Entretanto, sabe-se que quanto menor a partícula, mais organizada torna-se essa estrutura tridimensional <sup>9</sup>. Portanto, há melhor fluxo de nutrientes do meio de cultura para as células e maior sobrevivência das mesmas. Daí decorre a importância em desenvolver micropartículas capazes de assegurar o crescimento celular, uma vez que a faixa de tamanhos de micropartículas oscila de  $1\mu\text{m}$  a  $999\mu\text{m}$  <sup>10</sup>.

O desenvolvimento de micropartículas não é simples, visto que a solução de alginato acrescida de células é altamente viscosa, além do que, requer materiais sofisticados e caros. Portanto, adaptou-se um sistema gerador de micropartículas utilizado em uma tese de doutorado da UFRGS <sup>6</sup>, com algumas modificações a fim de produzir micropartículas para imobilizar a microalga *Chlorella vulgaris*.

Com o intuito de desenvolver micropartículas estáveis e uniformes, vários fatores precisam ser levados em consideração, como: concentração do alginato, altura de gotejamento, diâmetro da ponteira, fluxo de gotejamento da bomba peristáltica <sup>11</sup>. O fluxo de ar constante é outro fator que influencia na formação de micropartículas <sup>6</sup>.

O objetivo principal desse estudo é desenvolver partículas de alginato de cálcio entre  $1\mu\text{m}$  a  $999\mu\text{m}$  capazes de permitirem o desenvolvimento celular da microalga *Chlorella vulgaris*. Os objetivos particulares do estudo são: propor uma altura de gotejamento adequada para formação de partículas esféricas; formular, baseado na literatura, a concentração ideal da mistura alginato de sódio e cloreto de cálcio para formar esferas rígidas; demonstrar o crescimento do cultivo do ativo imobilizado.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no laboratório de Fermentações na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, câmpus Ponta Grossa.

**Cultivo de cultura de células.** As células da microalga *Chlorella vulgaris* foram cultivadas em MBM (Meio Bristol Modificado) à temperatura de  $25\pm 1^\circ\text{C}$ , sob iluminação de 2 lâmpadas fluorescentes de 15W, fluxo luminoso de 788,8 lux cada, em uma sala

do laboratório de Fermentações da UTFPR, câmpus Ponta Grossa em um erlenmeyer de 6L.

**Centrifugação das células de *Chlorella vulgaris*.** No fluxo laminar, foi retirada uma alíquota de 800mL de um Erlenmeyer contendo 6L do cultivo de cultura inicial. Essa alíquota foi distribuída em 16 tubos Falcon e centrifugada a 5000 rpm durante 30 minutos. Esse método foi baseado na literatura, com a diferença no tempo de centrifugação<sup>12</sup>. Descartou-se o sobrenadante, deixando 12,5mL em cada tubo Falcon. De cada tubo, retirou-se uma amostra de 6,25mL para adicionar na solução de 100mL de alginato 3%, totalizando uma solução de alginato acrescida do ativo 1,5%. Ainda foram misturados 6,25mL restantes do ativo de cada tubo Falcon a 100mL de água destilada. Dessa maneira, preparou-se a solução para produzir micropartículas e a solução de controle.

**Preparação de micropartículas com *Chlorella vulgaris* imobilizada.** No fluxo laminar, foi montado um sistema contendo uma solução 1,5% de alginato acrescida de células de *Chlorella vulgaris* à uma altura de 33cm que passava pela mangueira da bomba peristáltica à 31rpm e caía sobre uma solução de  $\text{CaCl}_2$  125mM, através de uma ponteira de micropipeta 200 $\mu\text{L}$  inclinada a 45° e inserida dentro do tubo de fluxo de ar proveniente do biorreator. A distância da mangueira proveniente do biorreator até o béquer contendo a solução de  $\text{CaCl}_2$  é de 1,5m. A altura da seringa até a superfície da solução de  $\text{CaCl}_2$  foi de 3cm. O esquema do sistema foi baseado na literatura<sup>6</sup> e está representado na figura 2. A montagem do sistema está apresentado na figura 3.

As microalgas encapsuladas foram deixadas em banho iônico ( $\text{CaCl}_2$ ) por 30 minutos para cura<sup>13</sup>. Posteriormente, as micropartículas foram filtradas com peneira metálica, lavadas com água destilada para remover  $\text{CaCl}_2$  não-ligado e colocadas em 750mL de MBM.

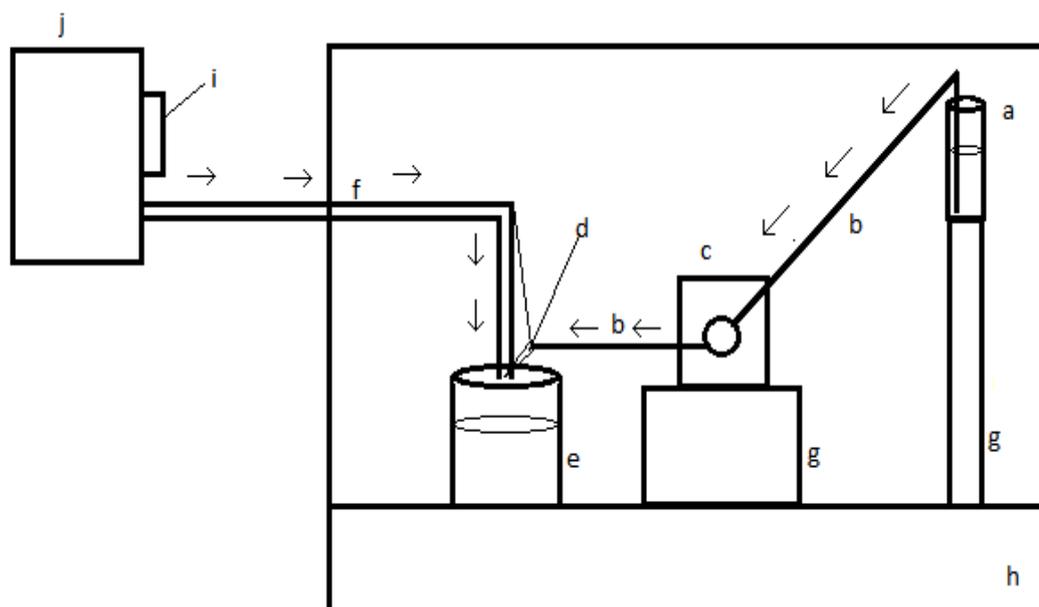


Figura. 2. Sistema gerador de micropartículas. a) Solução de alginato de sódio acrescida de *Chlorella vulgaris* (1,5%). b) Mangueira da bomba peristáltica. c) Bomba peristáltica Watson-

Marlow modelo 120S. d) Ponteira de micropipeta 200 $\mu$ L. e) Solução de CaCl<sub>2</sub> 125mM. f) Mangueira de 1,5m provinda do biorreator. g) Suportes auxiliares. h) Câmara de fluxo laminar. i) Rotâmetro. j) Biorreator.

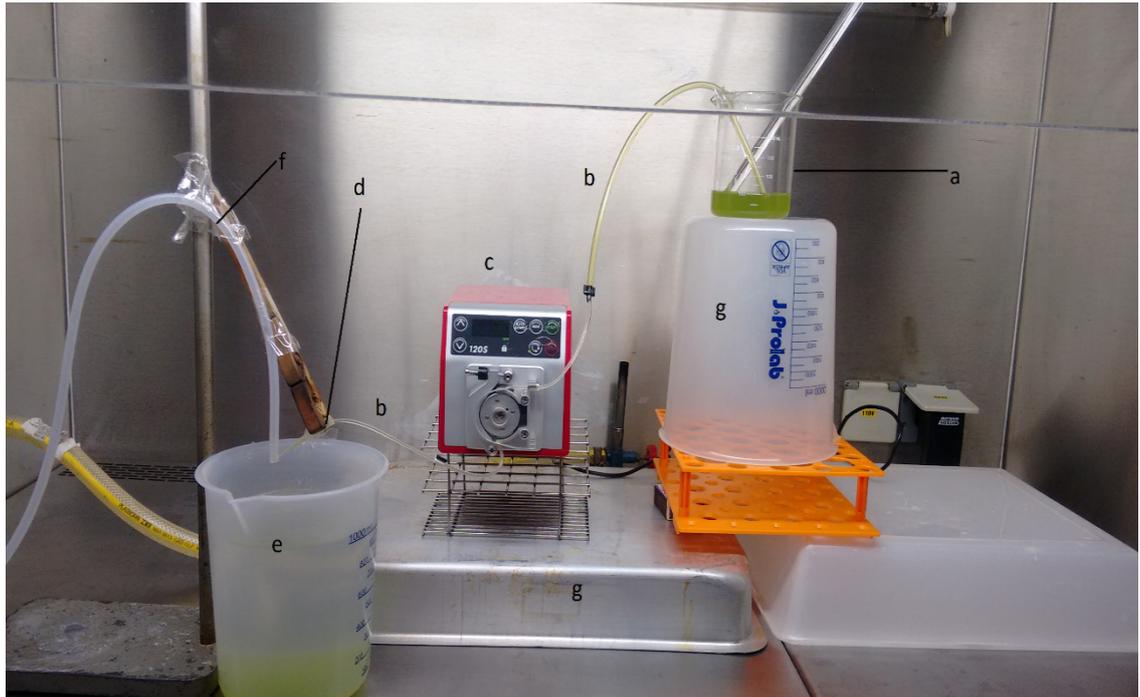


Figura 3. Montagem do sistema gerador de micropartículas.

**Cultivo das micropartículas imobilizadas e da solução de controle.** As micropartículas foram filtradas com auxílio de uma peneira metálica autoclavada e colocadas em um Erlenmeyer contendo 750mL de MBM. A solução de controle (100mL de células livres + 100mL de água destilada) foi adicionada em outro Erlenmeyer contendo 750mL de MBM. Ambas as amostras foram expostas às mesmas condições: temperatura de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , sob iluminação de 2 lâmpadas fluorescentes de 15W, fluxo luminoso de 788,8 lux cada, em uma sala do laboratório de Fermentações da UTFPR, câmpus Ponta Grossa.

**Redissolução das micropartículas.** As células de *Chlorella vulgaris* imobilizadas foram redissolvidas com citrato de sódio 50mM<sup>9</sup> e centrifugadas durante 30 minutos à 5000rpm para posterior realização de contagem do número de células.

**Contagem do número de células.** A contagem de células foi realizada na Câmara de Neubauer através do microscópio óptico com aumento final de 400x durante 7 dias.

**Medição do tamanho das micropartículas.** A medição do diâmetro médio das partículas foi feita com o auxílio de um micrômetro digital Western MC-3.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para realizar a imobilização da microalga, baseou-se no sistema gerador de microcápsulas da fig. 2, porém com algumas mudanças.

O sistema montado na literatura<sup>6</sup> propõe a altura do suporte 50cm acima da bomba peristáltica. No presente estudo, posicionou-se o copo de béquer contendo

alginate de sódio acrescido de *Chlorella vulgaris* à uma altura de 33cm acima da bomba peristáltica, devido às limitações físicas da câmara de fluxo laminar. Entretanto, verificou-se um fluxo constante da solução até a bomba peristáltica.

Outra mudança foi a ponteira de gotejamento. A literatura sugere a utilização de agulhas de 22G (0,7mm) <sup>14</sup> à 25G (0,5mm) <sup>6</sup>. No entanto, notou-se que a utilização de uma ponteira autoclavada de micropipeta de 200 $\mu$ L deixaria o sistema mais rígido e com a mesma eficiência do uso de uma agulha, pois o diâmetro da ponteira usada foi de 0,65mm, estando dentro dos diâmetros sugeridos pela literatura.

No sistema proposto por <sup>6</sup>, utilizou-se um cilindro de ar comprimido conectado a uma agulha com distância de 80cm entre esses. Neste estudo, utilizou-se fluxo de ar proveniente do biorreator disponível no laboratório de Fermentações da UTFPR - câmpus Ponta Grossa, com uma distância de saída da mangueira do biorreator até o local de gotejamento de 150cm.

Foram realizados alguns testes experimentais para analisar as melhores condições de formação de micropartículas esféricas e estáveis. Para propósitos práticos, considera-se que micropartículas rígidas são indicadas para imobilização de células vivas <sup>7</sup>. A necessidade de produzir micropartículas esféricas e estáveis reside no fato de que há melhor distribuição de células e melhor difusão de oxigênio. Quando não há distribuição uniforme de oxigênio, as células da superfície migram para o meio externo, ocasionando o rompimento da matriz <sup>15</sup>.

Sabe-se que a altura da ponteira até a superfície da solução de CaCl<sub>2</sub> influencia no formato da partícula <sup>16</sup>. Foram realizadas três tentativas de alturas diferentes para definir a micropartícula mais esférica.

A tabela 1 apresenta a esfericidade das partículas de acordo com a altura de gotejamento (desde a extremidade da ponteira até a superfície da solução de CaCl<sub>2</sub>).

Altura de gotejamento (cm)	Esfericidade
7	Partícula achatada
5	Partícula com cauda
3	Partícula esférica

Tabela 1. Esfericidade da micropartícula em função da altura do bico gotejador.

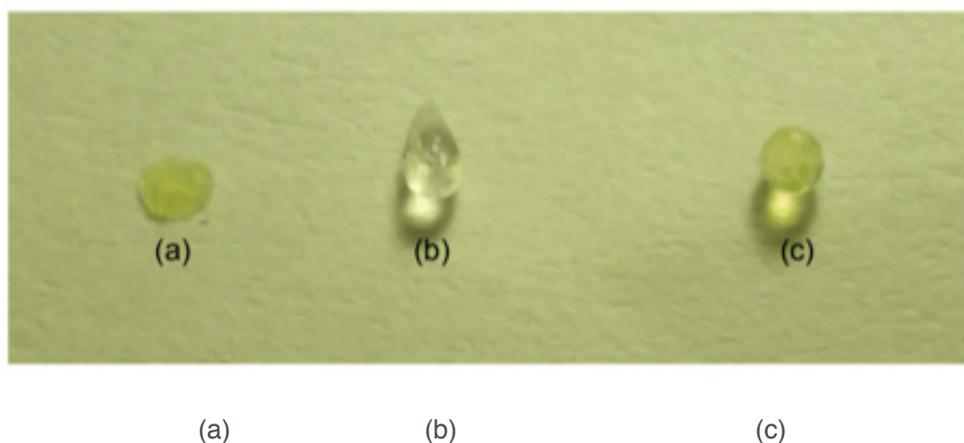


Figura. 4. Micropartículas com diferentes alturas de gotejamento: (a) com altura de 7cm; (b) com altura de 5cm; (c) com altura de 3cm.

A micropartícula (b) da figura 4 foi produzida sem microalga imobilizada para melhor representação da cauda produzida. Os resultados demonstram que quanto maior a altura da ponteira, mais irregular o formato da micropartícula. Isso pode ser explicado pelo fato de que quanto maior a altura, maior a velocidade de impacto da gota com a superfície de  $\text{CaCl}_2$  <sup>16</sup>.

No presente estudo, a esfericidade ideal da micropartícula foi encontrada a uma altura de 3cm desde a ponteira até a superfície da solução de  $\text{CaCl}_2$ .

O fluxo da bomba peristáltica é outro fator influencia diretamente no formato das micropartículas <sup>16</sup>. Quanto maior o fluxo da bomba peristáltica, mais irregulares se tornam as micropartículas <sup>13</sup>. Foram realizados testes anteriores e decidiu-se utilizar o fluxo constante de  $140 \text{ mL.h}^{-1}$  na bomba peristáltica como uma média dos fluxos sugeridos por <sup>13</sup>. Intercalou-se diferentes fluxos de ar provenientes do biorreator para analisar a esfericidade das micropartículas.

A tabela 2 mostra as combinações testadas do fluxo de ar e fluxo da bomba peristáltica.

Fluxo de ar ( $\text{L.min}^{-1}$ )	Fluxo da bomba peristáltica ( $\text{mL.h}^{-1}$ )	Esfericidade das micropartículas
8,0	140	Micropartículas com cauda
8,5	140	Micropartículas com cauda
9,0	140	Micropartículas com leve formato de gota
9,5	140	Micropartículas com leve formato de gota
10,0	140	Micropartículas esféricas

Tabela 2. Relação do fluxo de ar e da bomba peristáltica com a esfericidade das micropartículas.

A literatura sugere testar fluxos de ar de até  $15 \text{ L.min}^{-1}$  <sup>13</sup>, porém o biorreator utilizado neste estudo tem um fluxo de ar máximo de  $10 \text{ L.min}^{-1}$ . Portanto, não foram testadas vazões volumétricas acima desse valor.

O fluxo constante de  $140 \text{ mL.h}^{-1}$  foi utilizado porque notou-se que ao aumentar o fluxo da bomba peristáltica acima de  $140 \text{ mL.h}^{-1}$ , as partículas começaram a assumir formato achatado e irregular. Além disso, pelo esquema proposto, ao ultrapassar a vazão de  $140 \text{ mL.h}^{-1}$ , começa-se respingar alginato no tubo de fluxo de ar. Isso pode ocasionar a secagem e acúmulo do alginato na saída do tubo durante o tempo de produção das micropartículas, ocasionando diferenças significativas no tamanho e na forma das mesmas.

Outro ponto fundamental a ser analisado para obtenção de partículas esféricas e rígidas foi a utilização de diferentes combinações de concentrações de alginato

de sódio e cloreto de cálcio <sup>16</sup>. Concentrações de alginato de 1% até 4% em água são sugeridas e para CaCl<sub>2</sub> concentrações de 0,05M a 0,5M <sup>4</sup>. Decidiu-se fixar a concentração de 125mM para o CaCl<sub>2</sub> e testar diferentes concentrações de alginato de sódio. A resistência das micropartículas consta na Tabela 3.

Concentração de Alg. De sódio (%)	Concentração de Cloreto de Cálcio (M)	Resistência
1%	0,125	Micropartículas muito frágeis
2%	0,125	Micropartículas Estáveis
3%	0,125	Micropartículas resistentes

Tabela 3. Combinações de concentração de Alginato de sódio e Cloreto de Cálcio.

Três soluções distintas de alginato 1%, 2% e 3% foram preparadas e deixadas em três Erlenmeyer distintos contendo NaCl 5% durante 10 dias. Notou-se que as micropartículas contendo alginato 1% e 2% rompiam-se mais facilmente do que a solução de alginato 3% ao aplicar pressão mecânica. Isso se deve ao fato de que concentrações mais elevadas de alginato tornam a micropartícula mais rígida devido à formação de redes tridimensionais mais complexas <sup>17</sup>.

Retirou-se uma amostra com 100 micropartículas. Realizou-se uma média aritmética, que resultou no diâmetro médio de 890µm.

Para comprovar a eficácia da técnica de imobilização, foram realizadas contagens diárias de células durante 7 dias. Foram contadas células das micropartículas, células da microalga livre e possíveis células do meio de cultivo ao qual estavam inseridas as micropartículas.

O gráfico comparativo da concentração de células pelo tempo da microalga imobilizada com a microalga livre está expresso logo abaixo na Figura 5.

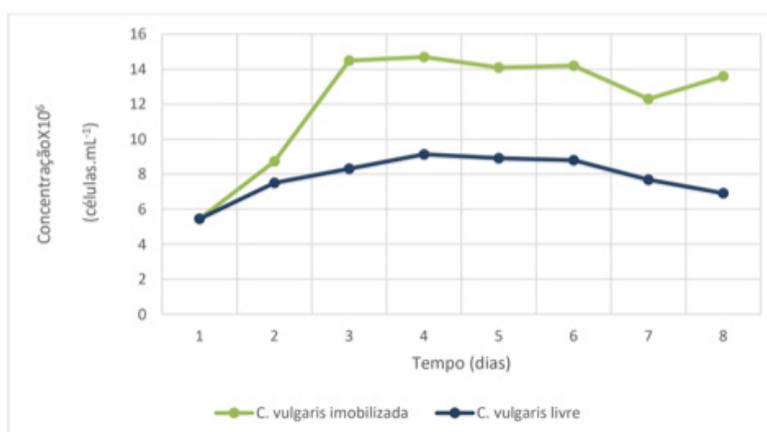


Figura. 5. Gráfico comparativo da microalga imobilizada com a microalga livre.

Nota-se através da Figura 5 que a partir do mesmo inóculo, as microalgas imobilizadas apresentaram maior crescimento celular em relação às microalgas livres. No último dia de contagem, as microalgas imobilizadas apresentaram valor de 1,36 x

$10^7$  células.mL<sup>-1</sup>, enquanto que na contagem das microalgas livres foram contabilizadas  $6,91 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>. Esse fato corrobora a transferência adequada de nutrientes e de oxigênio do meio para as micropartículas.

Além disso, foi analisado macro e microscopicamente o meio de cultivo das células imobilizadas, e não foi constatada nenhuma célula livre, o que evidencia que as partículas de alginato aprisionaram corretamente as células, não permitindo o seu escape pelos poros.

O pH ideal de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* fica em torno de 5,5 a 8,0 e qualquer mudança afeta diretamente na sua curva de crescimento<sup>2</sup>. O pH medido do meio de cultivo foi 7,0. O resultado da curva seguiu a tendência de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* inserida em um meio com esse pH.

## 4 | CONCLUSÕES

De maneira geral, as micropartículas produzidas obtiveram o tamanho de diâmetro médio de  $890\mu\text{m}$ , estando dentro da faixa de  $1\mu\text{m}$  a  $999\mu\text{m}$ . A busca de uma concentração de alginato e cloreto de cálcio, além de uma altura de gotejamento ideal, permitiram a formação de micropartículas esféricas e rígidas e proporcionaram o correto crescimento da microalga. A comprovação desse fato está no crescimento da microalga imobilizada.

O método de imobilização da microalga *Chlorella vulgaris* foi eficaz para sua obtenção e reutilização, visto que as micropartículas puderam ser facilmente peneiradas sem custos além dos materiais utilizados. Nessa perspectiva, o uso deste método propicia a aplicação da microalga imobilizada para fins de tratamento de resíduos, nutricionais, produção de energia, dentre outros, com custos mais baixos, pois o custo de obtenção e reutilização do microrganismo é significativamente menor.

## REFERÊNCIAS

1 BORZANI, W.; SCHMIDELL, W; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial: Fundamentos**. V.1. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

2 **Avaliação do crescimento da *Chlorella vulgaris* em diferentes pH objetivando sua inserção na matéria-prima do biodiesel**. XVII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2017.

3 GUISAN, J. M. **Immobilization of Ezymes and Cells**. Totowa: Humana Press: p.1-13. 2006.

4 BORZANI, W.; SCHMIDELL, W; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial: Fundamentos**. V.2. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

5 LIMA, A. M. F.; ANDREANI, L.; SOLDI, V. **Influência da adição de plastificante e do processo de reticulação na morfologia, absorção de água e propriedades mecânicas de filmes de alginato de sódio**. Química Nova, v. 30, No. 4, p. 832-837, 2007.

- 6 BRESSEL, T.A.B. **Sistema gerador de microcápsulas de alginato. Tese de Doutorado em Genética e Biologia Molecular** – UFRGS. Porto Alegre, p. 56, 2007.
- 7 MARTINSEN, A.; SKJÄK-BRAEK, G.; SMIDSRØD, O. **Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 33, p. 79 – 89, 1989.
- 8 GRANT, G.T.; MORRIS, E.R.; REES, D.A.; SMITH, P.J.C.; THOM, D.. **Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model.** *FEBS Letters*, v. 32, p. 195-198, 1973.
- 9 SIMPSON, N. E.; GRANT, S. C.; BLACKBAND, S. J.; CONSTANTINIDIS I. **NMR properties of alginate microbeads.** *Biomaterials*, v. 24, p. 4941-4948, 2003.
- 10 DIAS, J. A. C. **Nanopartículas poliméricas com aplicação na administração pulmonar de proteínas.** Dissertação em Ciências Farmacêuticas – Universidade do Algarve. Faro, p. 20, 2013.
- 11 FUNDUEANU, G., NASTRUZZI, C., CARPOV, A., DESBRIERES, J., RINAUTO, M.. **Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods.** *Biomaterials*, v. 20, p. 1427-1435, 1999.
- 12 MARCON, A. E. **Remoção de coliformes fecais com microalgas (*Chlorella*) imobilizadas em matriz de alginato de cálcio.** Dissertação em Engenharia Sanitária – UFRN. Natal, p. 31, 2005.
- 13 COSTA, B. S. **Micropartículas produzidas por gelificação iônica recobertas com gelatina de peixe e isolado proteico de soja.** Dissertação em Engenharia de Alimentos – UNICAMP. Campinas, p. 49, 2014.
- 14 **Esferas (Beads) de Alginato como Agente Encapsulante de Óleo de *Croton zehntneri* Pax et Hoffm.** *Polímeros*, vol. 20, nº 2, p. 112-120, 2010.
- 15 GIESE, E. C. **Potencial Biotecnológico do Uso de Micro-organismos Imobilizados em Gel de Alginato de Cálcio.** CETEM/MCTI : Rio de Janeiro, 2015.
- 16 TEIXEIRA, V. F. T. **Estudo da obtenção de biocatalisadores com matrizes de alginato de cálcio visando a produção de biodiesel.** Dissertação em Ciências e Tecnologias Agropecuárias – UENF. Campos dos Goytacazes, p.15, 2011.
- 17 ZIMMERMANN, A. L. S. **Desenvolvimento e avaliação de micropartículas contendo microrganismos viáveis utilizados como bioinseticida.** Tese de doutorado em Produção e Controle Farmacêuticos – USP. São Paulo, p.14, 2001.

## DESENVOLVIMENTO DE PÃO DE FORMA CONTENDO FARINHA MISTA DE MARACUJÁ E JABUTICABA

### Jamilly Salustiano Ferreira Constantino

Mestranda em Engenharia Química, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande – PB

### Julice Dutra Lopes

Profª Adjunta do Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB

**RESUMO:** O aproveitamento de alimentos em sua forma integral vem se destacando nos últimos anos como uma alternativa para o enriquecimento nutricional, bem como a utilização de cascas, talos e folhas. Em virtude disso, o objetivo do presente trabalho foi produzir farinha do albedo do maracujá amarelo (FAM) e da casca da jabuticaba (FCJ), desenvolver pães tipo forma enriquecidos com essas farinhas e caracterizá-los quanto as suas propriedades físicas e químicas. Foram elaboradas quatro formulações de pães, sendo uma formulação padrão, sem adição das farinhas (F1), e três formulações substituindo-se parcialmente a farinha de trigo por percentuais da FAM - 5% (F2), 10% (F3) e 15% (F4) e todas com adição de 2% de FCJ. Os pães elaborados com essas farinhas apresentaram alto teor de fibra bruta e concentrações de antocianinas totais.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Paciflora edulis f. Flavicarpa.*, *Myrciaria cauliflora* Berg., alimento

funcional.

**ABSTRACT:** The use of food in your entirety has been excelling in recent years as an alternative to the nutritional enrichment, as well as the use of bark, stems and leaves. As a result, the objective of this study was to produce flour of yellow passion fruit's albedo (FAM) and the bark of jaboticaba (FJC), develop form type breads enriched with these flours and characterize them as their physical and chemical properties. Four formulations were made of bread, being a standard formulation, without adding the flour (F1), and three partially substituting formulations wheat flour for the FAM-5% percentage (F2), 10% (F3) and 15% (F4) and all with addition of 2% of FJC. Breads made with these flours showed high levels of crude fiber and concentrations of total anthocyanins.

**KEYWORDS:** *Paciflora edulis f. Flavicarpa.*, *Myrciaria cauliflora* Berg., functional food.

### 1 | INTRODUÇÃO

O maracujá (*Passiflora edulis f. Flavicarpa*) é uma planta de clima tropical, sendo uma cultura em expansão tanto para o consumo *in natura* como para a produção de sucos, destacando-se o Brasil como grande produtor de maracujá. Já a jabuticabeira (*Myrciaria*

*cauliflora* Berg) pertence à família *Myrtaceae*, é de ocorrência espontânea em grande parte do Brasil e nativa da Mata Atlântica, sendo cultivada em outras regiões e em países sul-americanos (LIMA et al., 2008).

Segundo Gutkoski et al. (2007), a demanda por alimentos nutritivos está crescendo mundialmente e a sua ingestão de forma balanceada é a maneira correta de evitar ou mesmo corrigir problemas de saúde. Em virtude disso, o aproveitamento de alimentos em sua forma integral vem se destacando nos últimos anos como uma alternativa para o enriquecimento nutricional, como por exemplo, a utilização de talos, cascas e folhas. Estas partes dos frutos e hortaliças são ricas em fibras (LUPATINI et al., 2011).

Uma fonte de fibra solúvel bastante conhecida é a casca do maracujá amarelo. Esta casca é composta pelo flavedo (parte com coloração amarela) e albedo (parte com coloração branca), sendo esta parte rica em pectina, espécie de fibra solúvel que auxilia na redução das taxas de glicose no sangue, fonte de niacina (vitamina B3), ferro, cálcio e fósforo (CAMARGO et al., 2008; CÓRDOVA et al., 2005).

Córdova et al. (2005) sugeriram a utilização da casca do maracujá como farinha, na obtenção de produtos direcionados para pessoas que necessitam aumentar a ingestão de fibras para prevenir doenças, principalmente, àquelas relacionadas ao trato gastrointestinal e ao coração. Já a casca da jabuticaba possui propriedades bioativas, como no caso da farinha da casca de jabuticaba, rica em compostos fenólicos e antocianinas, sendo, portanto, uma alternativa para o uso em pães, bolos, sorvetes, biscoitos, barras de cereais, entre outros produtos (MARQUETTI, 2014).

Existe uma grande quantidade de antocianinas na casca da jabuticaba, dando coloração a fruta e funcionando como um corante natural. Estudos de vários pesquisadores têm demonstrado as diversas propriedades farmacológicas de flavonóides como a antocianina. Tem-se relatado que estas substâncias evitam a agregação de plaquetas, reduzem os teores de colesterol e triacilgliceróis e atuam como antioxidantes evitando doenças crônico-degenerativas. Também podem ser usadas como anti-inflamatórios, além de evitar a ocorrência de cataratas em diabéticos (HERTOG et al., 1993; PHILPOTT et al., 2004; TZENG et al., 1991).

Segundo o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Pão (BRASIL, 2000), o pão é um produto obtido pela cocção, em condições tecnologicamente adequadas, de uma massa fermentada, ou não, preparada com farinha de trigo e/ou outras farinhas que contenham naturalmente proteínas formadoras de glúten ou adicionadas das mesmas e água, podendo conter outros ingredientes. A classificação “Pão de Forma” é dada ao produto obtido pela cocção da massa em formas, apresentando miolo elástico e homogêneo, com poros finos e casca fina e macia. A Associação Brasileira das Indústrias de Biscoitos, Massas Alimentícias e Pães & Bolos Industrializados (Abimapi) afirma que a oferta de produtos integrais ou enriquecidos cresceu muito, ganhando destaque nas prateleiras dos supermercados (VIANA, 2015).

O uso de farinhas compostas em produtos de panificação tem finalidades

específicas, como por exemplo, melhorar as propriedades nutricionais do produto pela adição de farinhas de origem oleaginosa, rica em fibras ou outros compostos funcionais (SILVA, 1997).

Esta pesquisa teve como objetivo produzir e avaliar as características físicas e físico-químicas de pão de forma elaborado com substituição parcial de farinha de trigo por farinha do albedo do maracujá amarelo e farinha da casca de jabuticaba, visando à obtenção de um produto com alto teor de fibras e antocianinas.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção das farinhas

Os frutos do maracujá e jabuticaba utilizados nos experimentos foram adquiridos no mercado local da cidade de Campina Grande - PB, onde foram lavados e sanitizados e, posteriormente, feita a separação da polpa e das cascas de forma manual. A retirada do flavedo (parte amarela) da casca do maracujá foi realizada após cozimento das cascas, e em seguida, submeteu-se uma parte das cascas a um processo de maceração (imersão em água) durante 24 horas, para retirada do amargor característico do produto pela presença de compostos flavonoides, com posterior drenagem da água utilizando peneira plástica (SILVA et al., 2016). Outra parte do albedo não foi submetida ao processo de maceração, para que houvesse uma posterior comparação entre os dois processos.

O albedo do maracujá amarelo e a casca da jabuticaba foram dispostos em cestas de alumínio, de peso conhecido, e submetidos à desidratação em estufa com circulação de ar forçada com velocidade do ar a 2,0 m/s, nas temperaturas de 70 °C para o albedo do maracujá e 60 °C para a casca da jabuticaba. Estas temperaturas foram escolhidas após análise de estudos feitos por outros autores (FERREIRA et al., 2012; SILVA et al., 2016; ZAGO, 2014), que verificaram a eficiência do processo de secagem nestas temperaturas frente a conservação das características nutritivas destas farinhas.

Após a desidratação, o albedo do maracujá e a casca da jabuticaba foram triturados em liquidificador, obtendo-se farinhas de granulometria homogênea. As farinhas foram armazenadas em recipientes de vidro escuro e mantidas em temperatura de refrigeração ( $5 \pm 1$  °C) até o momento das análises.

### 2.2 Produção dos pães

Foram utilizados na formulação do pão de forma, a farinha do albedo do maracujá macerado e a casca de jabuticaba, sendo utilizada uma mistura de farinha de trigo, farinha do albedo do maracujá (FAM) e farinha da casca de jabuticaba (FCJ), conforme apresentado na Tabela 1. A quantidade de FCJ foi fixada em 2% e uma formulação apenas com farinha de trigo foi produzida e utilizada como formulação

controle. A quantidade de FCJ utilizada na formulação dos pães baseou-se em testes preliminares, sendo o teor de 2% uma quantidade adequada para que não ocorresse inibição da levedura durante a fermentação dos pães.

Proporção das farinhas (%)			
Formulação	Farinha de trigo	FAM	FCJ
F1	100	0	0
F2	93	5	2
F3	88	10	2
F4	83	15	2

Tabela 1 - Proporção de farinha de trigo, farinha do albedo de maracujá amarelo (FAM) e farinha da casca de jabuticaba (FCJ) utilizada nas formulações dos pães tipo forma

Os pães tipo forma foram produzidos seguindo a formulação fornecida pelo SENAI – PB, conforme apresentado na Tabela 2.

Ingredientes	Quantidades (%)
Farinhas (trigo, maracujá, jabuticaba) *	100
Sal refinado**	2
Açúcar**	4
Margarina zero trans**	3
Fermento biológico seco**	3
Melhorador de massa**	1
Água**	52
Leite em pó integral**	2

Tabela 2 – Formulação do Pão tipo forma

\*Com base nas quantidades definidas na Tabela 1

\*\*Com base em 100 partes de farinha

Para o preparo dos pães, os ingredientes foram misturados na masseira até o desenvolvimento do glúten. A massa foi modelada, colocada em forma de aço inoxidável untada e levada para câmara de fermentação. Após o período de fermentação (60 minutos) os pães foram assados por 45 minutos aproximadamente e retirados das formas após resfriamento completo. Posteriormente os pães foram fatiados, embalados em sacos de polipropileno e mantidos em temperatura ambiente até o momento das análises.

### 2.3 Análises físicas e físico-químicas das farinhas e dos pães de forma

Para caracterização físico-química das farinhas e dos pães foram realizadas, em triplicata, as seguintes análises: teor de água; cinzas; fibra bruta; proteína por meio da determinação de nitrogênio pelo método de Kjeldahl (N x 6,25), conforme Normas

do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). O conteúdo de lipídios foi determinado pelo método de Bligh e Dyer (1959). Estimou-se a fração de carboidratos não fibrosos por diferença, subtraindo-se de 100 os valores obtidos para teor de água, proteína, lipídio, fibra bruta e cinzas. Para análise de antocianinas na farinha da casca de jabuticaba (FCJ) e nos pães enriquecidos utilizou-se o método de Lees e Francis (1972) e os minerais da FCJ foram determinados através das cinzas por meio de Espectrômetro de Fluorescência de Raio X por Energia Dispersiva, modelo EDX – 720 (Shimadzu, Kyoto, Japão), com uso de nitrogênio líquido a  $-180^{\circ}\text{C}$ . Os parâmetros de cor foram determinados utilizando espectrofotômetro MiniScan HunterLab XE Plus (Reston, VA, EUA), no sistema de cor Cielab e a atividade de água foram medidas de forma direta em equipamento Aqualab, modelo 3TE (Decagon, Pulman - WA, EUA) na temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ .

Para avaliação de algumas características físicas dos pães ao longo de 7 dias de armazenamento, foi realizada análise de atividade de água, na temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ , nos dias 1, 4 e 7. A textura instrumental foi realizada nestes mesmos dias, e foi expressa pela força máxima aplicada para pressionar uma fatia de pão de forma (com espessura de 2,5 cm cada). Utilizou-se o texturômetro TA.XT Plus Texture Analyser (Stable Micro Systems) e probe P 36/R. As condições dos testes empregadas foram: força de compressão - 20 g; velocidade de teste - 1,7 mm/s; 40% de compressão da amostra; velocidade de pré-teste - 2,0 mm/s e velocidade de pós-teste - 5,0 mm/s. Com os dados de textura realizou-se um delineamento inteiramente casualizado, com comparação entre médias pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, onde para análise do mesmo utilizou-se o programa computacional Assistat versão 7.0 Beta (SILVA; AZEVEDO, 2009).

Os parâmetros de cor das farinhas e dos pães foram determinados utilizando-se o espectrofotômetro MiniScan HunterLab XE Plus (Reston, VA, EUA), no sistema de cor Cielab.

### **3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Secagem**

No presente trabalho verificou-se que para secagem do albedo (casca) do maracujá amarelo, a  $70^{\circ}\text{C}$ , foram necessários 13 horas, tanto para o albedo macerado quanto para o não macerado. Já para secagem da casca da jabuticaba, a  $60^{\circ}\text{C}$ , foram necessárias 10 horas.

#### **3.2 Análises Físico-químicas das farinhas e dos pães**

O albedo do maracujá *in natura* submetido ao processo de maceração apresentou teor de água de 96,11 g/100 g e o albedo não macerado teor de água de 93,41 g /100

g.

Os valores de teor de água obtidos foram semelhantes aos encontrados por Silva (2016), que estudou a obtenção e caracterização da farinha do albedo do maracujá para uso alimentício, encontrando o teor de água da casca (albedo) do maracujá de  $96,64 \pm 0,24$  g/100g com maceração, e  $94,03 \pm 0,08$  g/100g sem maceração, e superior aos valores encontrados por Gondim et al. (2005), que estudaram a composição centesimal e de minerais em cascas de frutas, encontrando o teor de água da casca do maracujá em torno de 87,64 g/100g.

O teor de água da casca de jabuticaba foi de 84,16 g/100 g. Este valor foi superior ao encontrado por Marquetti (2014), que ao estudar a obtenção e caracterização de farinha de casca de jabuticaba para adição em biscoito tipo *cooke*, encontrou 78,69 g/100 g.

A composição centesimal da farinha da casca de jabuticaba (FCJ), da farinha do albedo de maracujá (FAM), e dos pães elaborados, estão apresentados na Tabela 3.

Pode-se observar que o teor de água da FCJ encontrado foi quase o dobro do valor encontrado na FAM, provavelmente devido a menor temperatura de secagem utilizada. Resultados inferiores a estes foram obtidos por Ascheri et al. (2006), ao avaliar a farinha do bagaço de jabuticaba, encontrando teor de água de 7,08 g/100 g. Já Ferreira et al. (2012), encontraram valores de 12,05 g / 100 g para a farinha de jabuticaba. Com relação a FAM, o teor de água foi semelhante ao encontrado por Ferreira e Pena (2010) ao estudarem a secagem da casca do maracujá amarelo na temperatura de 70 °C, onde encontraram 6,0 g/100 g, e superior ao encontrado por Silva (2016) ao obter a farinha do albedo do maracujá a 70 °C, encontrando teor de água médio de 3,53 g/100 g. Pode-se observar também, que houve diferença no teor de água entre a formulação 1 (F1) e a formulação 4 (F4) dos pães. Os teores de água encontrados nas formulações dos pães variaram de 19,65% a 28,66%, com aumento do teor de água proporcional à adição das farinhas, e todos os pães apresentaram teor de água de acordo com a legislação brasileira, que permite um valor máximo de até 30% (BRASIL, 2000).

Parâmetros (g/100 g)	FCJ	FAM	F1	F2	F3	F4
Teor de água	$10,80 \pm 0,19$	$5,88 \pm 0,37$	$19,65 \pm 0,67^c$	$21,26 \pm 0,3^{bc}$	$23,72 \pm 0,36^b$	$28,66 \pm 0,90^a$
Cinzas	$1,98 \pm 0,04$	$5,11 \pm 0,23$	$1,20 \pm 0,00^b$	$1,23 \pm 0,33^b$	$1,57 \pm 0,04^{ab}$	$1,88 \pm 0,16^a$
Lipídios	$0,71 \pm 0,20$	$0,89 \pm 0,20$	$2,93 \pm 0,00^{ab}$	$2,26 \pm 0,67^b$	$3,45 \pm 0,40^{ab}$	$3,66 \pm 0,07^a$
Proteínas	$5,43 \pm 0,15$	$5,47 \pm 0,15$	$9,29 \pm 1,76^a$	$10,10 \pm 0,56^a$	$9,53 \pm 0,01^a$	$9,13 \pm 0,06^a$
Fibra Bruta	$20,40 \pm 0,46$	$43,77 \pm 0,68$	$1,63 \pm 0,15^d$	$5,40 \pm 0,17^c$	$6,50 \pm 0,30^b$	$8,8 \pm 0,20^a$
Carboidratos	$60,68 \pm 0,21$	$38,88 \pm 0,52$	$65,30 \pm 0,5^a$	$58,30 \pm 2,03^b$	$55,20 \pm 0,97^b$	$48,6 \pm 1,70^c$
Antocianinas (mg/100 g)	$67,66 \pm 0,02$	---	$0,00 \pm 0,00^c$	$2,00 \pm 0,04^b$	$2,22 \pm 0,03^a$	$2,02 \pm 0,02^b$

Tabela 3: Composição centesimal das farinhas da casca de jabuticaba, do albedo do maracujá e dos pães enriquecidos

FCJ – Farinha da casca de jabuticaba; FAM – Farinha do albedo de maracujá; F1 (pão controle); F2 (5% FAM e 2% FCJ); F3 (10% FAM e 2%FCJ); F4 (15% FAM e 2% FCJ). Médias com as mesmas letras, em uma mesma linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Pode-se observar que o teor de água da FCJ encontrado foi quase o dobro do valor encontrado na FAM, provavelmente devido a menor temperatura de secagem utilizada. Resultados inferiores a estes foram obtidos por Ascheri et al. (2006), ao avaliar a farinha do bagaço de jabuticaba, encontrando teor de água de 7,08 g/100 g. Já Ferreira et al. (2012), encontraram valores de 12,05 g / 100 g para a farinha de jabuticaba. Com relação a FAM, o teor de água foi semelhante ao encontrado por Ferreira e Pena (2010) ao estudarem a secagem da casca do maracujá amarelo na temperatura de 70 °C, onde encontraram 6,0 g/100 g, e superior ao encontrado por Silva (2016) ao obter a farinha do albedo do maracujá a 70 °C, encontrando teor de água médio de 3,53 g/100 g. Pode-se observar também, que houve diferença no teor de água entre a formulação 1 (F1) e a formulação 4 (F4) dos pães. Os teores de água encontrados nas formulações dos pães variaram de 19,65% a 28,66%, com aumento do teor de água proporcional à adição das farinhas, e todos os pães apresentaram teor de água de acordo com a legislação brasileira, que permite um valor máximo de até 30% (BRASIL, 2000).

O teor de cinzas indica a quantidade de resíduo mineral presente em um material. Foi encontrado conteúdo de cinzas para a FCJ em torno de 1,98 g/100 g. Teor inferior a esse foi obtido por Marquetti (2014) (1,13 g/100 g). Entretanto, teores superiores foram observados por Ascheri et al. (2006) (3,49 g/100g) e Ferreira et al. (2012) (3,89 g/100g). Em relação a FAM, Freire et al. (2014) encontraram valores de cinzas superiores (7,73 ± 0,18 g/100 g) aos encontrados neste estudo. Já com relação aos pães enriquecidos, observou-se que a medida que foi adicionado FAM na formulação, houve aumento do teor de cinzas, comparando com a formulação controle (F1). Essas diferenças são atribuídas aos minerais presentes nas farinhas. Borges et al. (2012) determinaram teor de cinzas em pães elaborados com farinha de quinoa e obtiveram concentrações superiores aos encontrados no pão controle.

A Embrapa Floresta (2015) realizou pesquisa sobre o valor nutricional da jabuticaba, encontrando cerca de 0,74 g/100g de lipídios na FCJ, sendo este resultado semelhante ao obtido no presente trabalho (0,89 g/100 g). Valor inferior a este foi encontrado por Silva (2016) (0,63 g / 100 g) em FAM obtida nas mesmas condições de secagem utilizadas neste estudo, enquanto Souza et al. (2008) encontraram valor superior (1,64 g/100 g). Observou-se ainda um aumento significativo na formulação F4 (15%FAM e 2% FCJ) com relação a formulação F2 (5% FAM e 2% FCJ).

Quanto ao teor de proteínas foram obtidos teores médios de 5,43 e 5,47 g/100 g, para a FCJ e FAM, respectivamente. Appelt et al. (2015) descreveram valor semelhante (6,4 g/100 g) de teor de proteína da FCJ obtida por secagem com circulação de ar

forçada a 55 °C. Ferreira et al. (2012) encontraram conteúdo semelhante (5,23 g/100 g) para FCJ. Comparando os valores para FAM, Souza et al. (2008) encontraram valores de proteínas superiores para a FAM em base úmida (11,76 g/ 100 g). A substituição parcial de farinha de trigo por FAM e FCJ, não interferiu no teor de proteína total dos pães, visto que não houve diferença significativa entre os resultados, o que pode ser explicado pelo baixo teor de proteínas das farinhas. Borges et al. (2011) encontraram ao trabalhar com substituição parcial da farinha de trigo pela farinha de linhaça, valores superiores a esse, que foi aumentando a medida que se adicionou farinha da formulação.

A determinação de fibra bruta mostrou que a FCJ e FAM são fontes de fibras, apresentando valores médios de 20,4 e 43,77 g/100 g, respectivamente. De acordo com a Portaria nº 27 do Ministério da Saúde (BRASIL, 1998), um produto alimentício é considerado fonte de fibras se apresentar no mínimo 3 g/100 g de fibras para alimentos sólidos. O conteúdo de fibras da FAM, se mostrou superior ao encontrado por Santos (2013) com 34,57 g/100 g, Santana et al. (2011), com 36,05 g/100 g, enquanto o teor de fibra da FCJ foi superior ao encontrado por Ferreira et al. (2012) (15,25 g/100 g). O elevado teor de fibra bruta encontrado demonstra a possibilidade de incorporação dessas farinhas no enriquecimento de diversos produtos alimentícios, como por exemplo, produtos de panificação.

Com relação a quantidade de fibra bruta, observou-se que a medida que foi acrescentado FAM, o teor de fibra bruta aumentou significativamente, quando comparado a formulação controle (F1). Vale ressaltar que a FAM foi a responsável por esse enriquecimento, por se tratar de um produto com alto teor de fibras, aproximadamente (43,8 g/100 g). A quantidade de fibras nos pães enriquecidos permite prever que pode ser considerado fonte de fibras segundo a legislação brasileira que preconiza no mínimo 3 g/100 g do alimento (BRASIL, 1998).

Os valores de antocianinas encontrados na FCJ, expõe elevadas concentrações do composto bioativo, apresentando valores superiores ao encontrado por Silva et al. (2010), que obtiveram 48,06 mg de antocianinas/100 g no extrato da casca de jabuticaba. Vedana et al. (2008), quando trabalharam com extratos hidroalcoólicos de uva, obtiveram 4,90 mg de antocianinas/100 g de uva, sendo esse valor bem inferior ao encontrado no extrato da FCJ. Como observado nas formulações dos pães com 2% da FCJ, houve um enriquecimento com antocianinas presentes na farinha, podendo ser considerada uma boa fonte de pigmentos antocianínicos por apresentar elevado teor desse composto, podendo ser usado para o enriquecimento de produtos alimentícios, como também uma alternativa viável para a obtenção de corantes naturais.

Os teores de minerais encontrados na farinha da casca de jabuticaba (FCJ) estão apresentados na Tabela 4.

Minerais	Teor (mg/100g)
Potássio (K)	1.650,00
Cálcio (Ca)	144,00
Fósforo (P)	93,00
Enxofre (S)	71,00
Ferro (Fe)	5,80
Zinco (Zn)	2,90
Manganês (Mn)	2,89
Cobre (Cu)	2,60
Rubídio (Rb)	2,26

Tabela 4 – Teor de minerais encontrados na farinha da casca de jabuticaba

Em relação ao conteúdo de minerais da FCJ, o mineral encontrado em maior quantidade foi o K, seguido por Ca, P, S, Fe, Zn, Mn, Cu e Rb. Resultados semelhantes foram obtidos por Ascheri et al. (2006), ao estudarem a caracterização do bagaço de jabuticaba, encontrando quantidades de potássio equivalente (1273,12 mg/100 g) na farinha elaborada, sendo este o mineral presente em maior quantidade.

### 3.3 Análises Físicas das Farinhas e dos Pães

#### 3.3.1 Cor instrumental

Os resultados dos parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  da análise de cor das farinhas e dos pães elaborados e a atividade de água das farinhas são mostrados na Tabela 5. Observando o valor de  $L^*$ , pode-se perceber que a FCJ trata-se de uma farinha escura, já que os valores de  $L^*$  definem a claridade da cor, sendo que 0 (zero) indica a cor totalmente preta e 100 (cem) cor totalmente branca. A coordenada de cor  $a^*$  varia do verde para o vermelho ( $-a^*$  a  $+a^*$ ), com isso pode-se perceber a presença de pigmentos avermelhados já que o valor médio correspondente do parâmetro  $a^*$  foi 10,30. A coordenada  $b^*$  refere-se a variação da tonalidade do azul ao amarelo ( $-b^*$  a  $+b^*$ ) e observou-se pequena presença de pigmentos amarelados. Resultados semelhantes a estes foram encontrados por Alves (2014) quando trabalhou com FCJ, avaliando a estabilidade de compostos nutricionais durante 12 meses de armazenamento.

A FAM apresentou luminosidade ( $L^*$ ) próxima a 100 (cem), sendo considerada clara, e o parâmetro  $a^*$  positivo mostra que FAM apresentou coloração ligeiramente vermelha e fortemente amarela ( $b^*$ ). Silva (2014), quando produziu FAM em diferentes temperaturas, encontrou valores de luminosidade superiores a este para luminosidade.

Farinhas	Parâmetros			
	Aw	Cor		
		L*	a*	b*
FCJ	0,293 ± 0,002	22,58 ± 0,02	10,30 ± 0,03	10,28 ± 0,12
FAM	0,359 ± 0,004	66,50 ± 0,03	6,16 ± 0,04	25,17 ± 0,07
F1	-	75,24 ± 0,0088 <sup>a</sup>	3,02 ± 0,02 <sup>c</sup>	24,16 ± 0,09 <sup>a</sup>
F2	-	52,15 ± 0,13 <sup>b</sup>	4,82 ± 0,10 <sup>a</sup>	16,57 ± 0,3 <sup>b</sup>
F3	-	52,04 ± 0,03 <sup>b</sup>	4,26 ± 0,75 <sup>b</sup>	16,49 ± 0,46 <sup>b</sup>
F4	-	50,97 ± 0,076 <sup>c</sup>	4,16 ± 0,008 <sup>b</sup>	15,99 ± 0,26 <sup>b</sup>

Tabela 5 – Análise de cor e atividade de água da farinhas da casca de jabuticaba (FCJ), da farinha do albedo de maracujá (FAM) e das formulações dos pães enriquecidos

L\* - luminosidade; a\* - transição da cor verde (-a\*) para o vermelho (+a\*); e b\* - transição da cor azul (-b\*) para a cor amarela (+b\*); F1 (pão controle); F2 (pão com 5% de FAM e 2% FCJ); F3 (pão com 10% FAM e 2% FCJ); F4 (pão com 15% FAM e 2% FCJ). Médias com as mesmas letras, em uma mesma coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A luminosidade das formulações dos pães tipo forma com propriedades funcionais, variou entre 75,24 (F1 – formulação controle) e 50,97 (F4 – formulação com 15% de FAM e 2% de FCJ). A luminosidade das formulações F1 e F2 foram semelhantes ao obtido por Silva et al. (2009a), quando trabalhou com barras de cereais enriquecidos com 30% do resíduo industrial de maracujá ( $49,0 \pm 0,3$ ). Os valores evidenciaram que ocorreu um escurecimento progressivo (redução no valor dos parâmetros L e b) e significativo ( $p < 0,05$ ), a medida que aumentou a quantidade de farinha mista na formulação.

Através dos parâmetros a e b constatou-se que todas as formulações apresentaram uma tendência por croma de menor intensidade para o amarelo e aspecto levemente vermelho. A formulação F4, por apresentar um valor de L menor, tendeu a uma coloração mais escura. Leoro (2007) observou que com o aumento da quantidade de farelo do maracujá adicionado na formulação, o valor de L diminuiu, produzindo extrusados mais escuros.

A atividade de água das farinhas foram menores que 0,60, o que segundo Chisté et al. (2006), é considerada um limite máximo para não permitir o desenvolvimento de microrganismos.

### 3.3.2 Textura Instrumental

A Tabela 6 apresenta os resultados das análises dos parâmetros de textura (firmeza, coesividade, gomosidade e mastigabilidade), avaliados por um período de 7 dias de armazenamento dos pães tipo forma, especificamente no 1º, 4º e 7º dia após produção.

Parâmetros	Formulação	1º dia após produção	4º dia após produção	7º dia após produção
<b>Firmeza (N)</b>	F1	24,20867 <sup>d</sup>	27.30600 <sup>c</sup>	31.10233 <sup>b</sup>
	F2	53,35300 <sup>c</sup>	78.91833 <sup>b</sup>	91.90434 <sup>a</sup>
	F3	83,00433 <sup>b</sup>	82.76566 <sup>b</sup>	131.75330 <sup>a</sup>
	F4	107,42530 <sup>a</sup>	131.73870 <sup>a</sup>	104.07970 <sup>a</sup>
<b>Coesividade</b>	F1	0.56164 <sup>a</sup>	0.46358 <sup>a</sup>	0.58929 <sup>a</sup>
	F2	0.49340 <sup>b</sup>	0.35336 <sup>a</sup>	0.23524 <sup>a</sup>
	F3	0.50123 <sup>ab</sup>	0.44828 <sup>a</sup>	0.40578 <sup>a</sup>
	F4	0.40279 <sup>c</sup>	0.31136 <sup>a</sup>	0.36655 <sup>a</sup>
<b>Gomosidade (N)</b>	F1	13.58629 <sup>c</sup>	12.43268 <sup>b</sup>	12.43268 <sup>b</sup>
	F2	26.24767 <sup>b</sup>	27.88717 <sup>a</sup>	27.88717 <sup>a</sup>
	F3	41.50120 <sup>a</sup>	36.79583 <sup>a</sup>	36.79583 <sup>a</sup>
	F4	43.15212 <sup>a</sup>	40.88499 <sup>a</sup>	40.88499 <sup>a</sup>
<b>Mastigabilidade (N)</b>	F1	13.58496 <sup>c</sup>	12.43087 <sup>b</sup>	16.98546 <sup>b</sup>
	F2	26.24068 <sup>b</sup>	27.88302 <sup>a</sup>	22.21754 <sup>b</sup>
	F3	41.50128 <sup>a</sup>	36.79456 <sup>a</sup>	53.11450 <sup>a</sup>
	F4	43.15475 <sup>a</sup>	40.88377 <sup>a</sup>	38.25254 <sup>ab</sup>

Tabela 6 – Variação dos parâmetros de textura instrumental (firmeza, coesividade, gomosidade e mastigabilidade) dos pães tipo forma, elaborados com diferentes concentrações de farinha de trigo, farinha do albedo de maracujá (FAM) e farinha da casca de jabuticaba (FCJ) durante 7 dias de armazenamento

Médias com as mesmas letras, em uma mesma coluna e para o mesmo parâmetro, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. F1 (Controle); F2 (5% FAM e 2% FCJ); F3 (10% FAM e 2% FCJ); F4 (15% FAM e 2% FCJ).

Observando os resultados da Tabela 6, verificou-se que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as formulações para todos os parâmetros analisados, no primeiro dia após produção dos pães.

Observa-se que a adição da FAM e da FCJ conferiu maior firmeza ao pão, onde quanto maior foi o acréscimo de FAM na formulação, maior a firmeza do pão, assim como também a medida que o tempo de armazenamento aumentou, a firmeza e a mastigabilidade dos pães aumentaram gradativamente. O aumento da dureza durante a estocagem normalmente ocorre em pães devido a retrogradação do amido, desnaturação das proteínas e redução da água na massa após a cocção (ESTELLER et al., 2004), assim, a formulação F4 com adição de 15% FAM e 2% de FCJ apresentou maior maciez e diminuição da mastigabilidade no último dia de análise. Essa diminuição da firmeza pode justificar-se pelo ganho de umidade durante o tempo de armazenamento. Silva et al. (2009b) encontraram resultados semelhantes, onde observaram um aumento na dureza devido aumento da percentagem de farinha de “okara” na formulação de pão de fôrma.

Para a coesividade, que é a extensão ao qual um material pode ser deformado antes da ruptura (SILVA et al., 2009b), as amostras apresentaram uma diminuição desse parâmetro com a adição das farinhas na formulação e com o tempo de estocagem.

Gomosidade é a energia requerida para desintegrar um alimento até estar pronto para deglutição (TUNCEL et al., 2014). A análise da gomosidade dos pães mostrou que com o aumento da adição das farinhas nas formulações, houve um aumento da mesma, e seus valores mantiveram-se constante a partir do 4º dia de armazenamento, não apresentando diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as amostras com adição de 10 e 15% de FAM (formulações F3 e F4).

O comportamento das formulações em relação ao parâmetro mastigabilidade, que pode ser definida pela força necessária para desintegrar um alimento sólido até ficar pronto para ser engolido (CARR et al., 2006), apresentaram resultados distintos, onde para as formulações com adição de 0 e 10% de FAM houve um aumento dos valores referentes a mastigabilidade, enquanto para as formulações com adição de 5 e 15% de FAM ocorreu uma diminuição do mesmo com o decorrer do período de estocagem.

### 3.3.3 Atividade de água durante armazenamento dos pães

A Tabela 7 apresenta os resultados das análises de atividade de água dos pães formulados com diferentes concentrações de FAM e FCJ, ao longo de 7 dias de armazenamento, especificamente no 1º, 4º e 7º dia após produção.

Formulação	Aw (Média ± Desvio Padrão)		
	1º Dia	4º Dia	7º Dia
F1	0,955 ± 0,0006 <sup>a</sup>	0,939 ± 0,00057 <sup>a</sup>	0,951 ± 0,001 <sup>a</sup>
F2	0,958 ± 0,0006 <sup>a</sup>	0,950 ± 0,0006 <sup>a</sup>	0,955 ± 0,001 <sup>a</sup>
F3	0,959 ± 0,00057 <sup>a</sup>	0,953 ± 0,0010 <sup>a</sup>	0,956 ± 0,001 <sup>a</sup>
F4	0,966 ± 0,00057 <sup>a</sup>	0,949 ± 0,0010 <sup>a</sup>	0,961 ± 0,001 <sup>a</sup>

Tabela 7 – Valores da média e desvio padrão da atividade de água das amostras de pão tipo forma elaborados com farinhas mistas do albedo do maracujá (FAM) e da casca de jabuticaba (FCJ)

Médias com as mesmas letras, em uma mesma linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. F1 (Controle); F2 (5% FAM e 2% FCJ); F3 (10% FAM e 2% FCJ); F4 (15% FAM e 2% FCJ).

A atividade de água  $A_w$  indica a quantidade de água disponível para realizar o movimento molecular e suas transformações e promover o crescimento microbiano (ZAMBRANO, 2005). Segundo Fennema (2000), produtos com atividade de água entre 0,80 e 0,88 favorecem o desenvolvimento de bolores e leveduras, respectivamente. O pão de forma é um produto de alta atividade de água, por esse motivo, normalmente os produtos disponíveis no mercado possuem baixa vida de prateleira. Os resultados apresentados na Tabela 7 comprovam esse fato, onde todas as amostras apresentaram valores de  $A_w$  superiores a 0,90, não havendo diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade entre os pães analisados. A grandeza dos valores apresentados coloca

todos os pães em uma faixa crítica de estabilidade. Estes valores foram semelhantes aos encontrados por Montenegro (2011) e Gragnani (2010), que também encontraram valores superiores a 0,90 para os pães de forma obtidos em seus estudos.

#### 4 | CONCLUSÃO

Observou-se que a FCJ e FAM apresentaram elevados teores de fibra bruta, podendo ser utilizadas como uma alternativa no enriquecimento de alimentos. A FCJ apresentou elevadas concentrações de minerais, principalmente o potássio, e elevado teor de antocianinas totais, indicando que a FCJ pode ser utilizada em formulações alimentícias, com intuito de aumentar a disponibilidade de alimentos que sejam fontes de substâncias antioxidantes como as antocianinas. A adição FAM nos pães elaborados indicou que com o aumento da sua concentração, aumentou-se a quantidade de fibra bruta e a adição de FCJ incluiu compostos bioativos, (antocianinas) nas formulações, podendo ser considerado um produto alimentício enriquecido.

Os resultados permitem concluir ainda que FAM e FCJ apresentam potencial de uso na elaboração de pães, sendo uma opção para aproveitamento de resíduos da indústria de alimentos no enriquecimento de um produto de grande consumo como o pão tipo forma. Os pães elaborados com farinha mista apresentaram elevada atividade de água (acima de 0,95) e os parâmetros de firmeza, coesividade e mastigabilidade aumentaram com o aumento da adição das farinhas e com o tempo de armazenamento dos pães.

#### AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pela bolsa de iniciação científica concedida para a realização desta pesquisa.

#### REFERÊNCIAS

ALVES, A. P. de C. **Farinha de casca de jaboticaba: armazenamento e aplicações**. Tese (Doutorado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2014. 103f.

APPELT, P.; CUNHA, M. A. A. da; GUERRA, A. P., KALINKE, C.; LIMA, V. A. de. Development and characterization of cereal bars made with flour of jaboticaba peel and okara. **Acta Scientiarum Technology**, v. 37, n. 1, p. 117-122, 2015.

ASCHERI, D. P. R.; ASCHERI, J. L. R.; CARVALHO, C. W. P. Caracterização da Farinha de Bagaço de Jaboticaba e Propriedades Funcionais dos Extrusados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 16, n. 4, 2006.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BORGES, J. T. da S.; PAULA, C. D. de; PIROZI, M. R.; OLIVEIRA, K. Qualidade Nutricional de Pão de

Forma Enriquecido com Farinha de Quinoa. **Revista Alimentos Hoy**, v. 21, n. 27, p. 55-67, 2012.

BORGES, J. T. da S.; PIROZI, M. R.; PAULA, C. D. de; RAMOS, D. L.; CHAVES, J. B. C. Caracterização Físico-química e Sensorial de Pão de Sal Enriquecido com Farinha Integral de Linhaça. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 29, n. 1, p. 83-96, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 90, de 18 de outubro de 2000. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Pão. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n.27, 13 de janeiro de 1998. Regulamento técnico referente à informação nutricional complementar (declarações relacionadas ao conteúdo de nutrientes). **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 16 jan. 1998. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/php/home.php>. Acesso em: 23 ago. 2016.

CAMARGO, P.; MORAES, C.; SCHEMBEGER, A.; SANTOS, C.P.; SCHEMIN, M. H.C. Rendimento da pectina da casca do maracujá em seus estádios diferentes de maturação: verde, maduro e senescência. In: SANTOS JUNIOR, G.; ALMEIDA, D. M.; MICHALOSKI, A. O. (Org.). **Série em Ciência e Tecnologia de Alimentos: agroindústria, energia e meio ambiente**. 9 ed. Ponta Grossa: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, v. 2., 2008.

CARR, L. G.; RODAS, M. A. B.; DELLA TORRE, J. C. M.; TADINI, C. C. (2006). Physical textural and sensory characteristics of 7-day frozen part baked French bread. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 39, n. 5, p. 540-547, 2006.

CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. O.; MATHIAS, E. A.; RAMOA JÚNIOR, A. G. Qualidade da farinha de mandioca do grupo seca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 861-864, 2006.

CÓRDOVA, K. R. V.; GAMA, T. M. M. T. B.; WINTER, C. M. G.; NETO, G. K.; FREITAS, R. J. S. Características físico-químicas da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis Flavicarpa Degener*) obtida por secagem. **Boletim do CEPPA**, v. 23, n. 2, p. 221-230, 2005.

EMBRAPA Florestas. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Valor Nutricional da Jabuticaba**. 2015. Disponível em: < <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1027136/1/2015folderjabuticabaef.pdf>>. Acesso em: 31 jan 2016.

ESTELLER, M. S.; YOSHIMOTO, R. M. de O.; AMARAL, L. R.; LANNES, S. C. da S. Uso de açúcares em produtos panificados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 602-607, 2004.

FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. (2. ed.) Zaragoza: Acribia, 2000.

FERREIRA, A. E.; FERREIRA, B. S.; LAGES, M. M. B.; RODRIGUES, V. A. F.; THÉ, P. M. P.; Pinto, N. A. V. D. Produção, caracterização e utilização da farinha de casca de jabuticaba em biscoitos tipo cookie. **Alimentos e Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 603-607, 2012.

FERREIRA, M. F. P.; PENA, R. S. Estudo da secagem da casca do maracujá amarelo. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.12, n.1, p.15-28, 2010.

FREIRE, C. C. L. L.; ZAMBELLI, R. A.; CHINELATE, G. C. B.; RODRIGUES, M. do C. P.; PONTES, D. F. Aplicação das Farinhas de Linhaça (*Linum usitatissimum* L.) e Maracujá (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) no Processamento de Pães com Propriedades Funcionais. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 1, n. 1, p. 01-09, 2014.

GONDIM, J. A. M.; MOURA, M. de F. V.; DANTAS, A. S.; MEDEIROS, R. L. S.; SANTOS, K. M. Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 825-827, 2005.

- GRAGNANI, M. A. L. **Produção e avaliação de pão de forma com triticale e enzimas transglutaminase microbiana**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2010.
- GUTKOSKI, L. C.; BONAMIGO, J. M. A.; TEIXEIRA, D. M. F.; PEDÓ, I. Desenvolvimento de barras de cereais à base de aveia com alto teor de fibra alimentar. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 355-363, 2007.
- HERTOG, M. G. L.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B.; KROMHOUT, D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. **Nutrition and Cancer**, v. 20, n. 1, p. 21-29, 1993.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ – IAL. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. (4. ed., 1. ed. digital). São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.
- LEES, D. H.; FRANCIS, F. J. Standardization of pigment Analyses in cranberries. **Hortscience**, v. 7, n. 1, p. 83-84, 1982.
- LEORO, M. G. V. **Desenvolvimento de cereal matinal extrusado orgânico à base de farinha de milho e farelo de maracujá**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2007. 147f.
- LIMA, A. de J. B.; CORRÊA, A. D.; ALVES, A. P. C.; PATTO ABREU, C. M.; DANTAS-BARROS, A. M. Caracterização Química do Fruto Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg) e de suas frações. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**. v.58, n.4, 2008.
- LUPATINI, A. L.; FUDO, R. M.; MESOMO, M. C.; CONCEIÇÃO, W. A. S.; COUTINHO, M. R. Desenvolvimento de Biscoito com Farinha de Casca de Maracujá-Amarelo e Okara. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 13, n. 3, p. 318-329, 2011.
- MARQUETTI, C. **Desenvolvimento e obtenção de farinha de casca de jabuticaba (*Plinia cauliflora*) para adição em biscoito tipo *cookie***. Dissertação (Mestrado Profissionalizante em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, PR. 2014. 116f.
- MONTENEGRO, F. M. **Avaliação do desempenho tecnológico de misturas de farinhas de triticale e trigo em produtos de panificação** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2011.
- PHILPOTT, M.; GOUID, K.S.; LIM, C.; FERGUSON, L.S. In situ and in vitro antioxidant activity of sweetpotato anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 6, p. 1511-1513, 2004.
- SANTANA, F. C.; SILVA, J. V.; SANTOS, A. J. A. O.; ALVES, A. R.; WARTHA, E. R. S. A.; MARCELLINI, P. S.; SILVA, M. A. A. P. Desenvolvimento de biscoito rico em fibras elaborado por substituição parcial da farinha de trigo, por farinha da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Favicarpa) e fécula de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 22, n. 3, p 391-399, 2011.
- SANTOS, D. A. M. dos. **Formulação de biscoito tipo cookie a partir da substituição percentual de farinha de trigo por farinha de casca de abóbora (*Curcubita* máxima) e albedo de maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*)**. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2013. 77f.
- SILVA, E. C.; SILVA, W. P.; SILVA, E. T.; LOPES, J. D.; GUSMÃO, R. P. Obtenção e Caracterização da Farinha do Albedo de Maracujá (*Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*) para uso alimentício. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 11, n. 3, p. 69-74, 2016.

- SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Principal components analysis in the software assistat – statistical attendance. In: **7th World Congress On Computers In Agriculture**. Reno, Nevada, 2009.
- SILVA, G. J. F.; CONSTANT, P. B. L.; FIGUEIREDO, R. W.; MOURA, S. M. Formulação e estabilidade de corantes de antocianinas extraídas das cascas de jabuticaba (*Myrciaria ssp.*). **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 3, p. 429-436, 2010.
- SILVA, I. Q.; OLIVEIRA, B. C. F.; LOPES, A. S.; PENA, R. S. Obtenção de barra de cereais adicionada do resíduo industrial do maracujá. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 20, n. 2, p. 321-329, 2009a.
- SILVA, L. H.; MENACHO, L. M. P.; VICENTE, C. A.; SALLES, A. S.; STEEL, C. J. Desenvolvimento de pão de fôrma com a adição de farinha de “okara”. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 4, p. 315-322, 2009b.
- SILVA, M. R. **Caracterização química e nutricional da farinha de jatobá (*Hymenaea stigonocarpa Mart.*): desenvolvimento e otimização de produtos através de testes sensoriais afetivos**. Tese (Doutorado em Ciência da Nutrição). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, 1997. 154p.
- SOUZA, M. W. S. de; FERREIRA, T. B. O.; VIEIRA, I. F. R. Composição centesimal e propriedades funcionais tecnológicas da farinha da casca do maracujá. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 1, p. 33-36, 2008.
- TUNCEL, N. B.; YILMAZ, N.; KOCABIYIK, H.; UYGUS, A. The effect of infrared stabilized rice bran substitution on B vitamins, minerals, and phytic acid content of pan breads: part II. **Journal of Cereal Science**, v. 59, n. 2, p. 162-166, 2014.
- TZENG, S. H.; KO, W. C.; KO, F. N.; TENG, C. M. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. **Thrombosis Research**, v. 64, n. 1, p. 91-100, 1991.
- VEDANA, M. I. S.; ZIEMER, C.; MIGUEL, O. G.; PORTELLA, A. C.; CANDIDO, L. M. B. Efeito do processamento na atividade antioxidante de uva. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 2, p. 159-165, 2008.
- VIANA, K. **Conheça as diferenças entre alimento integral e enriquecido**. Abimapi, Associação Brasileira das Indústrias de Biscoitos, Massas Alimentícias, Pães e Bolos Industrializados, 2015. Disponível em: <https://maringa.odiario.com/viva-sabor/2015/08/conheca-as-diferencas-entre-alimento-integral-e-enriquecido/1448905/>. Acesso em: 19 nov. 2018.
- ZAGO, M. F. C. **Aproveitamento de resíduo agroindustrial de jabuticaba no desenvolvimento de formulação de cookie para a alimentação escolar**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO. 2014. 124f.
- ZAMBRANO, F.; HIKAGE, A.; ORMENESE, R. C. C.; RAUENMIGUEL, A. M. Efeito das gomas guar e xantana em bolos como substitutos de gordura. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 63-71, 2005.

## DETERMINAÇÃO DO EHL (EQUILÍBRIO-HIDROFÍLICO LIPOFÍLICO) DO ÓLEO DE ABACATE

**Laíssa Aparecida Praxedes dos Reis**

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Ponta Grossa – Paraná

**Alessandra Cristine Novak Sydney**

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Ponta Grossa – Paraná

**RESUMO:** O óleo de abacate é um produto amplamente utilizado na área cosmética devido às suas propriedades de hidratação e regeneração da pele. Para o uso de qualquer óleo em emulsões cosméticas é preciso conhecer o seu Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico (EHL), pois esse valor é determinante para a escolha dos tensoativos do sistema. A determinação do EHL do óleo foi realizado pelo método de Griffin (1949), que consiste em multiplicar as massas de Span 80 e Tween 80 utilizados no preparo da emulsão por seus respectivos EHL e em seguida dividir este valor pela soma das massas dos tensoativos. As emulsões foram realizadas pelos métodos de inversão de fases e de preparação por simples mistura. Para analisar as emulsões foi empregado o método turbidimétrico, que permite estimar o tamanho das partículas da emulsão, sendo assim possível identificar qual sistema possui maior estabilidade. De acordo com esse método, os maiores valores de turbidez indicam menores partículas na

emulsão. A partir da análise turbidimétrica foi determinado que o melhor método para preparar as emulsões é o inversão de fases. A partir disso foram realizadas emulsões utilizando óleo de abacate de três fabricantes (Mix das Essências, BioEssência e Duom). O EHL foi determinado a partir das emulsões com maiores valores de turbidez (723, 935 e 726, respectivamente), ou seja, produziram emulsões mais estáveis. As emulsões que apresentaram esses valores de turbidez apresentaram EHL de 7,89, 7,82 e 7,97, respectivamente. Com isso pode-se determinar que o EHL do óleo de abacate equivale a  $(7,89 \pm 0,06)$ .

**PALAVRAS-CHAVE:** Óleo de abacate, EHL, emulsão, turbidez

**ABSTRACT:** Avocado oil is a product widely used in the cosmetic area due to its properties of hydration and skin regeneration. For the use of any oil in cosmetic emulsions it is necessary to know its hydrophilic-lipophilic balance (HLB), because it is determinant for the choice of the surfactants of the system. The EHL determination of the oil was performed according to the Griffin (1949), which consists in multiplying the Span 80 and Tween 80 masses used in the preparation of the emulsion by their respective EHL and then dividing this value by the sum of the masses of the surfactants. The emulsions were performed by the methods of

phase inversion and simple mixing. To analyze the emulsions, the turbidimetric method was used, which allows to estimate the size of the particles of the emulsion, being possible to identify which system has greater stability. According to this method, the higher turbidity values indicate smaller particles in the emulsion. From the turbidimetric analysis it was determined that the best method to prepare the emulsions is the phase inversion. From this were made emulsions using avocado oil from three manufacturers (Mix das Essências, BioEssência e Duom). The HLB was determined from the emulsions with the highest turbidity values (723, 935 and 726, respectively), that is, they produced more stable emulsions. Emulsions that showed these turbidity values showed HLB of 7,89, 7,82 and 7,97, respectively. Thus, it can be determined that the HLB of avocado oil is equivalent to  $(7,89 \pm 0,06)$ .

**KEYWORDS:** Avocado oil, HLB, emulsion, turbidity

## 1 | INTRODUÇÃO

Produtos cosméticos são muitos comuns no dia-a-dia, sendo utilizados com o intuito de embelezar, proteger e higienizar a pele, cabelos e unhas. A cosmetologia é uma área que está em constante desenvolvimento, sendo recentemente incorporado à esta ciência o termo nanocosméticos. Este termo é designado para descrever aqueles cosméticos com a capacidade de transportar e liberar fármacos ou ativos na pele de modo mais eficiente. (GOMES; GABRIEL, 2006; GALEMBECK; CSORDAS, 2009)

O pioneiro no estudo referente à aplicação transdérmica foi Rein, que em 1924 afirmou que a maior barreira para o transporte transdérmico é a epiderme mais externa da pele, também conhecida como estrato córneo (REIN, 1924 apud PRAUSNITZ; MITRAGOTRI; LANGER, 2004). A partir de então surgiram diversas propostas para ultrapassar esta barreira e permitir que fármacos e vitaminas atinjam as camadas externas da pele e até mesmo a corrente sanguínea (TORCHILIN, 2006). Segundo Tadros e Kessell (2004) uma das alternativas para o transporte transdérmico é a nanotecnologia, pois suas partículas possuem tamanhos menores que 5 nm facilitando assim a absorção de substâncias ativas.

A microemulsão, apesar de conter na sua denominação o prefixo micro, que indica uma dimensão de  $10^{-6}$ m, é um sistema termodinamicamente estável composto por nanopartículas, que usualmente possuem dimensões da ordem de  $10^{-9}$ m. A sua formação consiste em mistura de água, óleo, tensoativo e co-tensoativos (FORMARIZ et al., 2005; DAMASCENO et al., 2010). Para que a microemulsão seja efetivamente capaz de realizar o transporte de ativos é necessário que a mesma seja um sistema estável, e para isso a escolha de seus componentes é de suma importância.

Os tensoativos e co-tensoativos exercem um papel importante na microemulsão, pois estes são responsáveis por quebrar a tensão superficial da água fazendo com que haja interação com o óleo originando assim uma emulsão. A escolha deste composto deve ser feita com cautela, pois muitos destes podem causar irritação e queimação na

pele. (DALTIM, 2011; HEGDE; VERMA; GHOSH, 2013).

O óleo de abacate (*Persea americana*) é um composto que possui um alto teor de hidratação, sendo rico em vitaminas, proteínas e potássio. Uma outra propriedade deste óleo é que ele auxilia na cicatrização e na formação do colágeno. Devido às suas propriedades, o óleo de abacate é amplamente utilizado na indústria cosmética e farmacêutica (TANGO; TURATTI, 1992; SOARES; ITO, 2000). Por ser um composto que possui muitas propriedades já apreciadas por diferentes indústrias, o óleo de abacate se torna um composto promissor para a sua utilização em microemulsões.

Outro ponto de atenção na escolha dos componentes de uma microemulsão é conhecer o equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) do óleo, para que a escolha do tensoativo e co-tensoativo a ser utilizado seja feita adequadamente afim de formar uma emulsão mais estável.

O equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) é definido como sendo o equilíbrio entre o tamanho e a força de grupos hidrofílicos e lipofílicos que compõe a estrutura de emulsificantes (tensoativos e co-tensoativos). Com o intuito de classificar estes compostos, foi designado valores para o EHL que variam de 1 a 40. O valor de EHL para tensoativos iônicos não ultrapassa o valor 20, já para tensoativos não iônicos, que possuem uma alta polaridade, o valor de EHL pode chegar a 40. É importante ressaltar que o EHL e a solubilidade são características do emulsificante que diferem entre si, porém, possuem uma certa relação, onde emulsificantes com baixos valores de EHL tendem a se solubilizar em óleo formando emulsões do tipo A/O mais estáveis, já por um outro lado, compostos com altos valores de EHL tendem a se solubilizar em água formando emulsões O/A mais estáveis. Entretanto, essa relação não é tão exata, pois podem existir diferentes emulsificantes com o mesmo valor de EHL, porém, com solubilidades diferentes (GRIFFIN, 1949; HOLMBERG et al., 2002; DALTIM, 2011).

## 2 | MÉTODOS

Para a determinação do EHL do óleo foi utilizado o método descrito por Griffin (1949), que consiste em relacionar as massas do co-tensoativo Span 80 ( $m_S$ ) e tensoativo Tween 80 ( $m_T$ ) com seus respectivos valores de EHL 4,7 e 15, como mostrado abaixo

$$\text{Equação 1 – Determinação do EHL}$$
$$\text{EHL} = \frac{(m_S \cdot \text{EHL}_S) + (m_T \cdot \text{EHL}_T)}{(m_S + m_T)}$$

Foram realizados 4 experimentos, sendo cada um deles composto por 9 emulsões. Emulsões nas quais foram preparadas a partir de uma mistura de Span 80 e Tween 80, óleo de abacate (extraído por prensagem à frio) e água, nas proporções 1:2:7 respectivamente. A mistura de co-tensoativo e tensoativos foi realizada nas

proporções 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9.

O primeiro experimento (1A) foi realizado com o óleo de abacate do fabricante Mix da Essências sendo o método utilizado o da preparação por simples mistura, os compostos foram misturas e agitados durante 5 minutos no Vortex (Global Trade Technology, XH-CU) à temperatura ambiente.

O segundo experimento (2A) foi realizado com o mesmo óleo, porém pelo método da inversão de fases. Método este que consistiu na mistura e aquecimento em banho maria (Novatecnica) a 80°C do óleo de abacate e o Tween 80, sendo em um outro recipiente realizado o mesmo processo para a mistura Span 80 e água. Após o aquecimento a mistura Span 80 e água foi vertida na mistura Tween 80 e óleo e mantidos sob agitação no Vortex (Global Trade Technology, XH-CU) até que a temperatura atingisse 25±5°C. Após o preparo das emulsões, as mesmas foram mantidas em repouso por 24 horas e depois foram realizadas análises turbidimétricas.

A análise da turbidez em emulsões permite identificar qual emulsão possui um menor tamanho de partícula, atribuindo assim uma maior estabilidade ao sistema. Após o repouso da amostra, a mesma foi agitada e um alíquota foi inserida no equipamento (Policontrol – AP2000) através de uma cubeta, sendo este processo realizado para as 9 amostras. Ao inserir a amostra no equipamento, o mesmo emite uma luz que incide na amostra atravessando-a e mostrando o valor da transmitância (NTU) no visor.

Valores altos de NTU significa que as partículas da solução são menores, pois não absorvem tanta luz, por outro lado, valores de NTU baixos significa que mais luz ficou retida entre as partículas da emulsão, sendo assim pode-se dizer que as partículas neste caso são maiores .

O terceiro e quarto experimento (3A e 4A) foram realizados de acordo com o método descrito no experimento 2, porém os óleos utilizados foram dos fabricantes BioEssência e Duom respectivamente.

Para testar a influência do co-tensoativo na emulsão com óleo de abacate foram realizados dois experimentos. No primeiro (1B) foram preparados 9 emulsões contendo Tween 80, óleo de abacate (Mix das Essências) e água nas proporções 1:2:7. Para o segundo (2B) experimento foram preparadas 9 emulsões contendo uma mistura de Span 80 e Tween 80, óleo de abacate (Mix das Essências) e água nas mesmas proporções do experimento anterior.

Após o preparo das emulsões as mesmas foram mantidas em repouso por 24 horas à temperatura ambiente e em seguida analisadas no microscópio.

### 3 | RESULTADOS

O preparo de emulsões é uma técnica puramente experimental quando se trata em definir formulações, tamanho da partícula e estabilidade. Então com o intuito de estudar a melhor técnica para o preparo de emulsões com o óleo de abacate foram realizados os experimentos 1A e 2A, sendo os resultados de suas análises

turbidimétricas dispostos na Tabela 1.

Emulsão	Turbidez (NTU) Simples Mistura	Turbidez (NTU) Inversão de Fases
1	154	306
2	215	576
3	308	723
4	151	702
5	156	389
6	143	378
7	113	353
8	130	244
9	141	277

Tabela 1 – Análise turbidimétricas de dois diferentes métodos de preparação de emulsões

Fonte: Autoria própria (2018)

Analisando a Tabela 2 é possível verificar que o método de inversão de fases possui valores de turbidez relativamente mais altos do que se comparado ao outro método. A análise realizada se baseia na transmitância de um feixe de luz que incide na amostra, sendo assim valores mais altos de turbidez implica que a luz passou diretamente pela amostra não sendo absorvida pela partícula, ou seja, as gotículas da amostra são menores daquelas que possuem um menor valor de turbidez. Dado a isso, foi definido que o método de inversão de fases nos leva à um sistema que se aproxima mais de uma microemulsão.

Com o preparo e análise dos experimentos 3A e 4A, a Tabela 2 foi construída, sendo assim possível comparar a turbidez e o EHL dos três fabricantes de óleo de abacate.

Emulsão	Mix das Essências		BioEssência		Duom	
	Turbidez (NTU)	EHL	Turbidez (NTU)	EHL	Turbidez (NTU)	EHL
1	306	5,75	413	5,71	473	5,73
2	576	6,98	553	6,72	638	6,75
3	723	7,89	935	7,82	726	7,97
4	702	8,75	731	8,81	559	9,02
5	389	9,74	496	9,87	239	9,86
6	378	10,99	644	10,87	278	10,99
7	353	11,90	395	11,83	383	11,90
8	244	12,91	434	12,82	281	12,97
9	277	13,86	460	13,94	248	13,94

Tabela 2 - Análise turbidimétricas e cálculo do EHL das emulsões

Fonte: Autoria própria (2018)

Mesmo possuindo valores de EHL próximos, foi verificado que os valores de turbidez são consideravelmente. Esta diferença pode ser explicada pela quantidade de ácidos graxos contidos no óleo, pois pode haver variações no tempo e temperatura de extração do mesmo, alterando assim as quantidades de ácidos encontrados no óleo.

Para os experimentos 1B e 2B não foi calculado o valor do EHL, pois o intuito foi testar a influencia do tensoativo e co-tensoativo na emulsão. Temos então o resultados dispostos a seguir.

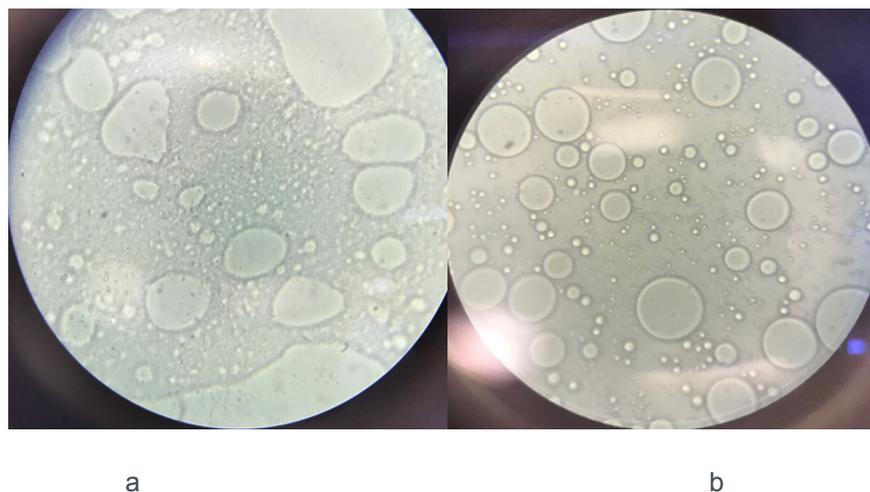


Figura 1 – Micrografia (40µm) da emulsão contendo Tween 80/ Span 80/óleo de abacate/água (a) e Micrografia (40µm) da emulsão contendo Tween 80/óleo de abacate/água (b)

Fonte: Autoria própria (2018)

A Figura 1-b mostra um sistema com partículas de tamanhos variados e sem uma forma definida, por outro lado a Figura 1-a mostra um sistema com partículas esféricas bem definidas, porém com tamanhos diferenciados. Analisando as figuras, pode-se observar que uma emulsão com co-tensoativo resulta em uma mistura mais homogênea e definida.

#### 4 | CONCLUSÃO

No preparo de emulsões contendo óleo de abacate, o método de inversão de fases apresentou maiores valores de turbidez, ou seja, forma emulsões cujas partículas são pequenas e por isso se torna um sistema mais estável.

Na análise da turbidez dos experimentos, pode-se concluir que a emulsão 3 apresentou um maior valor de transmitância para os diferentes fabricantes, sendo possível concluir que o EHL do óleo de abacate é  $7,89 \pm 0,06$ . Além disso, temos que em emulsões com o óleo de abacate é necessário o uso de um co-tensoativo para que o sistema forme partículas mais uniformes ajudando assim na estabilidade do sistema.

Com o estudo do EHL do óleo de abacate foi possível conhecer o comportamento

deste óleo em emulsão. Verificou-se a influência da metodologia e do uso de co-tensoativos para o preparo das mesmas, e com isso foi possível obter um sistema emulsionado composto por pequenas gotículas.

A partir do EHL encontrado para o óleo é possível fazer diferentes combinações com diferentes tensoativos e co-tensoativos que possuem um EHL semelhante, sendo possível encontrar componentes de baixo custo, que geram um produto de mesma qualidade ou até mesmo superior.

## REFERÊNCIAS

- FORMARIZ, T. P.; et al. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas**. v. 41, n. 3, p. 301-313, jul./set. 2005.
- DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicação**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2011.
- DAMASCENO, B. P. G. L.; et al. Microemulsão: um promissor carregador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 32, p. 9-18, set. 2010.
- GALEMBECK, F.; CSORDAS, Y. **Cosméticos: a química da beleza**. Sala da leitura – PUC. 2009. Disponível em: <[http://web.ccead.puc-rio.br/condigital/mvsl/Sala%20de%20Leitura/conteudos/SL\\_cosmeticos.pdf](http://web.ccead.puc-rio.br/condigital/mvsl/Sala%20de%20Leitura/conteudos/SL_cosmeticos.pdf)>. Acesso em: 31 mai. 2018.
- GOMES, R. K.; GABRIEL, M. **Cosmetologia: Descomplicando os princípios ativos**. 2. ed. São Paulo: Livraria Médica Paulista, 2006.
- GRIFFIN, W. C. Classification of surface-active agentes by “HLB”. **Journal of the society of cosmetic chemists**. p. 311-326, 1949.
- HEGDE, R. R.; VERMA, A.; GHOSH, A. Microemulsion: new insights into the ocular drug delivery. **ISRN Pharmaceutics**. p. 1-11, jun. 2013.
- HOLMBERG, K.; et al. **Surfactants and polymers in aqueous solution**. 2. ed. John Willey, 2002.
- PRAUSNITZ M. R.; MITRAGOTRI, S.; LANGER, R. Current status and future potential of transdermal drug delivery. **Nature Reviews**. v. 3, p. 115-124, fev. 2004.
- SOARES, H. F.; ITO, M. K. O ácido graxo monoinsaturado do abacate no controle das dislipidemias. **Revista de ciências médicas**. v. 9, n. 2, p. 47-51, mai./ago. 2000.
- TADROS, T.; KESSELL, L. Stabilizing nanodispersions in personal care and cosmetic applications. **Cosmetics and Toiletries**, n. 119, p. 41-46, 2004.
- TANGO, J. S.; TURATTI, J. M. **Abacate: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. 2. ed. Campinas: ITAL, 1992.
- TORCHILIN, V. P. **Nanoparticulates as drug carriers**. Londres: Imperial College Press, 2006.

## ESTUDO DA TOXICIDADE DE *Combretum leprosum* Mart.: TESTE *ALLIUM CEPA*

### **Valéria Moura de Carvalho**

Centro Universitário - UNINOVAFAPI  
Teresina – Piauí

### **Raidan Costa Rodrigues**

Centro Universitário - UNINOVAFAPI  
Teresina – Piauí

### **Kelly Maria Rêgo da Silva**

Faculdade Mauricio de Nassau Campus Aliança  
Teresina – Piauí

### **Elizângela de Carvalho Nunes**

Centro Universitário - UNINOVAFAPI  
Teresina – Piauí

### **Sâmya Katya Barros Guimarães**

Centro Universitário - UNINOVAFAPI  
Teresina – Piauí

### **Brenda Lois Barros dos Santos**

Centro Universitário - UNINOVAFAPI  
Teresina – Piauí

### **Cairo Hilbert Santos de Melo**

Universidade Federal do Piauí- UFPI  
Teresina – Piauí

### **Juliane Moreira Ramos**

Centro Universitário - UNINOVAFAPI  
Teresina – Piauí

### **Wanderson Ferreira Martins**

Centro Universitário - UNINOVAFAPI  
Teresina – Piauí

### **Gabrielle Costa Bento Campos**

Centro Universitário - UNINOVAFAPI  
Teresina – Piauí

### **Adão Correia Maia**

Centro Universitário - UNINOVAFAPI  
Teresina – Piauí

### **Antonio Lima Braga**

Faculdade Mauricio de Nassau Campus Aliança  
Teresina – Piauí

### **Jadielson dos Santos**

Universidade Federal do Piauí- UFPI  
Teresina – Piauí

**RESUMO:** O *Combretum leprosum* Mart. é um tipo de arbusto de pequeno porte também conhecido como mufumbo, mofumbo, cipoaba e pente-de-macaco. É utilizado pelas suas propriedades afrodisíacas, sedativas, expectorantes e hemostáticas, assim como existe estudos farmacológicos do extrato desse arbusto que sugerem atividades biológicas com efeitos antiulcerogênico, antiinflamatório e antiproliferativo, e contra a forma promastigota de *Leishmania amazonenses*. O presente estudo teve como objetivo verificar a toxicidade de extrato aquoso de *C. leprosum* Mart. Para a avaliação a toxidade desse arbusto foi utilizada a metodologia de *Allium cepa* devido ao seu baixo custo. Os resultados mostraram que o índice mitótico observado foi de interfase 48,94%; prófase 49,64%; metáfase 4,54%; anáfase 3,84% e telófase 1,06 %. Com esses valores

é possível constatar que o extrato aquoso de *C. leprosum* Mart. nas concentrações utilizadas nesse teste tem atividade tóxica. O estudo indica que precisa reforçar a necessidade de estudos futuros para estabelecer um perfil químico desse extrato, pois são utilizados popularmente para tratar várias patologias, sem um conhecimento certo sobre as suas propriedades e efeitos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Plantas medicinais, Toxicidade, Extrato.

**ABSTRACT:** The *Combretum leprosum* Mart. is a type of small shrub also known as mufumbo, mofumbo, cipoaba and monkey comb. The aphrodisiac, sedative, expectorant and hemostatic properties, as well as the pharmacological studies of the shrub extract that are part of the biological functions of antiinflatogenic, antiinflammatory and antiproliferative, and against a promastigote form of *Leishmania amazonenses*. The present study had as objective to verify the toxicity of the aqueous extract of *C. leprosum* Mart. For a toxicity of this bush an *Allium cepa* methodology was used due to its low cost. The results were that the mitectual index was 48.94%; prophase 49.64%; metaphase 4.54%; anaphase 3.84% and telophase 1.06%. With these values it is possible to verify the aqueous extract of *C. leprosum* Mart. in which we may experience the test has toxic activity. The evaluation of which extralised the exact evidence for development, the profile of the multiple infrastructures, such as specific properties to their multiple pathology, without one unknown index in their properties and effects.

**KEYWORDS:** Medicinal plants, Toxicity, Extract.

## 1 | INTRODUÇÃO

Nos primórdios do século passado a humanidade sempre utilizou plantas para uso medicinal, e quem faz uso popular delas sabe que possui atividade biológica a partir da sua transformação química. A indústria farmacêutica até hoje utiliza substâncias ativas das plantas na fabricação de medicamentos isso se deve pela diversificada flora existente (FERREIRA et al., 2011).

Segundo Michelin et al. (2005), as doenças têm relação com a falta de saneamento básico para a população, sendo comum nos países em desenvolvimento. A desnutrição e a dificuldade de acesso aos medicamentos são outros fatores que leva a cronificação dessas doenças.

Segundo Lima et al. (2011), os vegetais têm sido muito utilizados para fins láticos e curativos no tratamento de infecções, entre a diversidade existente encontram-se aqueles que são objetos para esse estudo. Atualmente existem muitos trabalhos sendo desenvolvidos para a busca de novas espécies de plantas com atividade tóxica.

*Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae) é um tipo de arbusto de pequeno porte que cresce principalmente no nordeste do Brasil, onde é conhecido como mufumbo, mofumbo, cipoaba e pente-de-macaco. No uso popular, os extratos são feitos em diferentes partes da planta como a raiz, caule e folhas, e são conhecidos

pelas suas propriedades supostamente afrodisíacas, sedativas, expectorantes e hemostáticas (ALVES FILHO et al., 2015).

De acordo com Teles et al. (2011), o estudo farmacológico com os extratos e compostos isolados de diferentes partes da *C. leprosum* Mart, sugerem que as atividades biológicas possuem efeitos antiulcerogênico, antiinflamatório e antiproliferativo, e contra a forma promastigota de *Leishmania amazonenses*.

O conhecimento sobre as plantas tóxicas e os efeitos adversos que elas podem causar é importante para a população, pois várias espécies podem ter uso medicinal e espécies forrageiras tóxicas causam prejuízo à produção animal. Diante disso o presente estudo teve como objetivo verificar a toxicidade de extrato aquoso de *C. leprosum* Mart.

## 2 | METODOLOGIA

Para a avaliação da toxicidade de *C. leprosum* Mart. foi utilizada a metodologia de *Allium cepa* devido ao seu baixo custo. As análises tiveram início no dia 1º de agosto de 2016 e término no dia 4 de setembro do mesmo ano. Os bulbos foram postos para germinar com a parte inferior mergulhada em solução contendo 50 mL de H<sub>2</sub>O destilada. Após aparecimento de raízes os bulbos foram expostos em contato com o extrato vegetal em teste, durante um período de 48 horas.

Após esse período, as raízes com a coifa com um tamanho por volta de 2 cm foram retiradas. Aproximadamente seis raízes foram mantidas nos bulbos para realização do processo de controle, onde os mesmos retornavam para água destilada durante um período de 24 horas. Logo após, foram feitas lâminas e analisadas em microscópio para contagem de células.

Os meristemas radiculares foram armazenados em microtubos contendo fixador Carnoy por 24 horas e posteriormente, as raízes foram lavadas em água destilada por três vezes e armazenadas em álcool 70% sob refrigeração até a confecção das lâminas. Foram realizados esfregaços em lâminas aguardando a secagem em temperatura ambiente, e logo após a coração e nova secagem. Realizou-se a contagem de 5000 células em microscopia óptica na objetiva de 40X para registro de células com anomalias no ciclo mitótico.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O índice mitótico geral observado foi de interfase 48,94%; prófase 49,64%; metáfase 4,54%; anáfase 3,84% e telófase 1,06 %. Com esses valores é possível constatar que o extrato aquoso de *C. leprosum* Mart. nas concentrações utilizadas nesse teste tem atividade tóxica.

De acordo com Pereira et al. (2017), os efeitos da toxicidade da *C. leprosum*

Mart. podem causar alterações nos índices mitóticos, que na verdade é o número total de células que se dividem no ciclo celular, levando ao aumento do mesmo, com isso leva à proliferação celular descontrolada e à formação de tecidos tumorais; também pode fazer com que haja uma diminuição do índice mitótico, caracterizando a ação química no crescimento e no desenvolvimento do organismo exposto.

Ainda de acordo com os autores, além da avaliação das preparações florestais para efeitos citotóxicos, a casca de *C. leprosum* Mart. também foi utilizada para estimar a toxicidade dos ratos. O extrato que foi tirado da casca, o hidroalcoólico mostrou uma toxicidade aguda quando administrado por via oral e intraperitoneal em camundongos machos, entretanto este mesmo extrato não mostrou toxicidade reprodutiva em ratos fêmeas, ou seja, não promoveu atividade estrogênica ou antiestrogênica ou toxicidade nos estágios embrionários (implantação, fertilização ou organogênese), sem mortalidade fetal.

Segundo Lopes et al. (2012), o epicatequina é um composto isolado da fração hidroalcoólica de *Combretum leprosum* Mart. e é conhecido principalmente pelas suas propriedades antioxidantes. Existem vários estudos que avaliam o uso desta substância para o tratamento de doenças cardiovasculares e para a prevenção de câncer. Foi demonstrada a possível ação antinociceptiva do epicatequina, onde tem a capacidade de bloquear os canais de sódio, estruturas que estão intimamente ligadas à ativação de fibras sensoriais.

De acordo com os resultados do estudo de Silva et al. (2015), o composto estudado, o lupane, que é isolado a partir de *C. leprosum* Mart. tem uma citotoxicidade moderada, não induz a produção de TNF- $\alpha$  e IL-10 e não atua em topoisomerasas humanas.

## 4 | CONCLUSÃO

Este trabalho reforça a necessidade de se ter um conhecimento maior sobre as propriedades químicas dos extratos que são utilizados popularmente para tratar várias patologias, sem um conhecimento certo sobre as propriedades químicas e seus efeitos.

## REFERÊNCIAS

ALVES FILHO, F.C.; CAVALCANTI, P.M.S.; PASSAGLIA, R.C.A.T.; BALLEJO, G. **Extrato das cascas de *Combretum leprosum* causa relaxamento dependente de endotélio de longa duração em artérias isoladas.** Einstein, v. 13, n.3, p. 395-403, 2015.

FERREIRA, F.S.; SANTOS, S.C.; BARROS, T.F.; ROSSI-ALVA, J.C.; FERNANDEZ, L.G. **Atividade antibacteriana in vitro de extratos de *Rhizophora mangle* L.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v.13, n.3, 2011.

LACOUTH-SILVA, F.; XAVIER, C.V.; DA S SETÚBAL, S.; PONTES, A.S.; NERY, N.M.; DE CASTRO, O.B.; FERNANDES, C.F.; HONDA, E.R.; ZANCHI, F.B.; CALDERON, L.A.; STÁBELI, R.G.; SOARES,

A.M.; SILVA-JARDIM, I.; FACUNDO, V.A.; ZULIANI, J.P. **The effect of 3 $\beta$ , 6 $\beta$ , 16 $\beta$ -trihydroxylup-20(29)-ene lupane compound isolated from *Combretum leprosum* Mart. on peripheral blood mononuclear cells.** BMC Complementary and Alternative Medicine, v. 15, 2015.

LIMA, E.R.; MOREIRA, L.S.; FACUNDO, V.A.; SILVA-JARDIM, I.; TELES, C.B.G. **AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DO EXTRATO ETANÓLICO E TRITERPENO LUPANO OBTIDOS DE *COMBRETUM LEPROSUM* CONTRA MICROORGANISMOS.** SABER CIENTÍFICO, v. 3, n. 1, p. 53-69, 2011.

LOPES L.S.; MARQUES R.B.; FERNANDES H.B.; PEREIRA S.S.; AYRES M.C.; CHAVES M.H.; ALMEIDA F.R. **Mechanisms of antinociceptive action of (-)-epicatechin obtained from the hydroalcoholic fraction of *Combretum leprosum* Mart. & Eic. in rodents.** Journal of Biomedical Science, v.19, n.1, p.68-73, 2012.

MICHELIN, D.C.; MORESCHI, P.E.; LIMA, A.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; PAGANELLI, M.O.; CHAUD, M.V. **Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 15, n. 4, p.316-320, 2005.

PEREIRA, J. C. S.; CÂMARA, C. C.; BARROSO COELHO, L. C. B.; SILVA, M. D. **Insights on Pharmacological Properties of *Combretum leprosum* Mart.** Biotechnology Journal International, v.17, n.3, p.1-13, 2017.

TELES, C.B.G.; MOREIRA, L.S.; SILVA, A.A.E.; FACUNDO, V.A.; ZULIANI, J.P.; STÁBELI, R.G.; SILVA-JARDIM, I. **Activity of the Lupane isolated from *Combretum leprosum* against *Leishmania amazonenses* promastigotes.** Journal of the Brazilian Chemical Society, v.22, n.5, 2011.

## ESTUDO E MODELAGEM CINÉTICA HETEROGÊNEA DA REAÇÃO DE CETALIZAÇÃO DO GLICEROL COM ACETONA UTILIZANDO ZEÓLITAS DO TIPO H-BEA E H-FER COMO CATALISADORES

### Vinicius Rossa

UFU, Faculdade De Engenharia Química -  
Laboratório GPCATT  
Uberlândia – MG

### Gisel Chenard Díaz

UFRJ, Escola de Química - Laboratório GreenTec  
Rio de Janeiro – RJ

### Yordanka Reyes Cruz

UFRJ, Escola de Química - Departamento de  
Processos Orgânicos - Laboratório GreenTec.  
Rio de Janeiro – RJ

### Sibele Berenice Castellã Pergher

UFRN, Instituto de Química - Departamento de  
Química do Petróleo - LABPMOL  
Natal – RN

### Donato Alexandre Gomes Aranda

UFRJ, Escola de Química - Departamento de  
Engenharia Química - Laboratório GreenTec.  
Rio de Janeiro – RJ

**RESUMO:** O Solketal comercial é conhecido como Augeo™ SL 191 e é produzido pela Rhodia (membro da Solvey Group), destaca-se por ser um solvente de evaporação lenta, derivado da glicerina que é considerada uma fonte renovável. Apresenta baixa toxicidade para a saúde humana e para o meio ambiente. É um ótimo solvente para resinas e polímeros, substituindo os solventes derivados do petróleo e pode ser utilizado como aditivo de (bio)

combustíveis. As zeólitas foram adquiridas no PROCAT/UFRJ e possuem metodologias de síntese e produção próprias. Um abrangente estudo cinético foi realizado para a reação de cetalização do glicerol com acetona utilizando catalisadores heterogêneos H-BEA ( $X_{A=}$  74% em 180min), e H-FER ( $X_{A=}$  57 % em 180min), nos modelos de Langmuir-Hinshelwood-Hougen-Watson (LHHW) e Eley-Rideal (ER). Foi verificado também que o catalisador mais ativo (H-BEA) pode ser utilizado por 4 vezes sem necessitar de lavagens ou pré-tratamentos entre as reações em reator batelada. Pelo cálculo de TOF para todos os catalisadores foi verificado que é possível substituir o catalisador homogêneo (PTSA) pelos catalisadores heterogêneos (H-BEA e H-FER) no processo industrial de cetalização do glicerol com acetona.

**PALAVRAS-CHAVE:** Glicerol, Solketal, Modelagem Cinética Heterogênea.

**ABSTRACT:** Commercial Solketal is known as Augeo™ SL 191 and is produced by Rhodia (a member of the Solvey Group), which stands out as a slow evaporation solvent derived from glycerin which is considered a renewable source. It has low toxicity to human health and the environment. It is a good solvent for resins and polymers, replacing solvents derived from petroleum and can be used as an additive of (bio)

fuels. Zeolites were purchased from PROCAT/ UFRJ and have their own methodologies synthesis and production. A comprehensive kinetic study was performed for the ketalization reaction using homogeneous PTSA catalyst ( $X_{A=}$  67% to 180min) for cases where there was or was not inhibition by water; using heterogeneous H-BEA catalysts ( $X_{A=}$  74% to 180min), and H-FER ( $X_{A=}$  57% to 180min) in the Langmuir-Hinshelwood-Hougen-Watson (LHHW) and Eley-Rideal (ER) models It was also verified that the most active catalyst (H-BEA) can be used 4 times without washing or pretreatment among reactions in batch reactor. By the calculation of TOF for all the catalysts it was verified that it is possible to replace the homogeneous catalyst (PTSA) by the heterogeneous catalysts (H-BEA and H-FER) in the industrial process of ketalization of glycerol with acetone.

**KEYWORDS:** Glycerol, Solketal, Heterogeneous Kinetic Modeling.

## 1 | INTRODUÇÃO

Para cada litro de biodiesel produzido por transesterificação de óleos e/ou gorduras são obtidos 100 mL (10 %) de glicerina. Mesmo que vários produtos contenham glicerina ou glicerol em sua formulação ainda não é o suficiente para atender a demanda. Sendo necessário convertê-la em produtos de maior valor agregado. Assim surgiu a gliceroquímica que abrange reações do tipo cetalização, acetalização, carbonatação, desidratação, esterificação, eterificação, hidrogenólise, oxidação, cloração entre outras. (SANCHEZ et al., 2010; MOTA et al., 2009; NANDA et al., 2016; REDDY et al., 2011; ROYON et al., 2011; ROSSA et al., 2017) Neste trabalho foi estudado a produção de Solketal pela reação de cetalização de glicerol com acetona na presença de catalisadores ácidos (H-BEA e H-FER).

O Solketal é um excelente aditivo para a gasolina, pode ser usado na formulação do óleo diesel e biodiesel. (MOTA et al., 2009) Também pode ser usado como “Solvente Verde”.

A cetalização do glicerol gera compostos oxigenados ramificados, porém quando a reação é realizada com acetona a seletividade é maior para a molécula do Solketal (2,2-Dimetil-[1,3]dioxolan-4-il)metanol, que possui anel de cinco membros. E menor para a molécula de 2,2-dimetil-[1,3]dioxan-5-ol, que possui anel de seis membros, Figura 1 (ROYON et al., 2011).

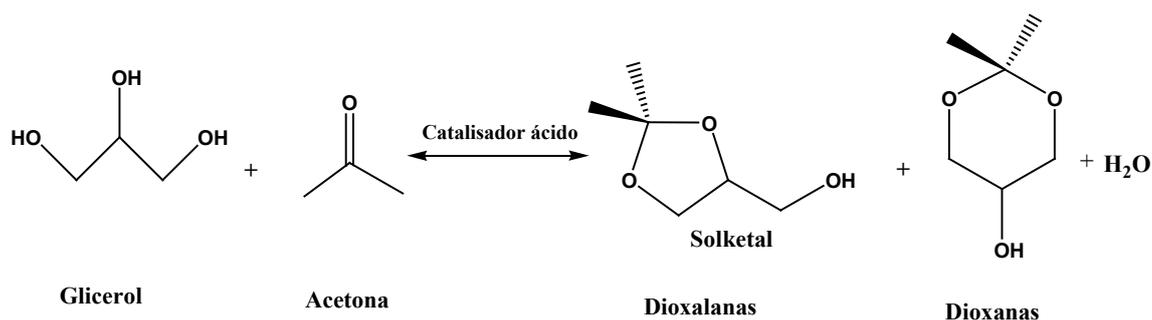
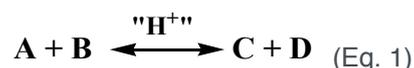


Figura 1 – Reação de cetalização do glicerol com acetona. (Adaptado de REDDY et al., 2011)

A reação química que representa a produção de Solketal foi dada por:



onde **A**, **B**, **C** e **D** correspondem respectivamente ao glicerol, à acetona, ao Solketal e à água. O “H<sup>+</sup>” refere-se à catálise ácida. O estudo cinético em catálise heterogênea é composto por sete etapas: (1) Difusão Externa (reagentes); (2) Difusão Interna (reagentes); (3) Adsorção (reagentes); (4) Reação Química; (5) Dessorção (produtos); (6) Difusão Interna (produtos); (7) Difusão Externa (produtos).

O estudo cinético, neste trabalho, considerou apenas as etapas químicas: (3), (4) e (5). Sendo propostos dois mecanismos: Eley-Rideal (ER) e Langmuir-Hinshelwood-Hougen-Watson (LHHW) para descreverem as transformações químicas e físicas (HOUGEN et al., 1959; ELEY et al., 1940) que ocorrem na reação de cetalização do glicerol com acetona ao utilizar as zeólitas H-BEA e H-FER como catalisadores.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

Os catalisadores H-BEA (ZEOLYST S. A., SAR 19) e H-FER (PROCAT-UFRJ, SAR 16) foram calcinados a 500°C/4 h, rampa de 10°C/min e armazenados a 100°C até o momento das reações.

As cinéticas das reações foram realizadas em um reator batelada (300mL) alimentado com 40g de glicerol (0,43mol), 100g de acetona (1,72 mols), ambos da PROQUIMIOS (99.5 % P.A.), e 5% (em relação à massa de glicerol). As condições reacionais foram 60°C, 700rpm, pressão autógena, razão molar de 1:4. Alíquotas foram coletadas em diferentes tempos entre 5-180 minutos. Após, com os valores de conversão ( $X_A$ ) para cada tempo (t) foi possível modelar as cinéticas com o auxílio do Software STATISTICA 12.0. A metodologia aplicada para definir os modelos cinéticos foi adaptada de HOUGEN (1959), ELEY (1940) e SHEKARA (2011).

**REUSO DO CATALISADOR MAIS ATIVO:** O teste de reuso consistiu em reutilizar o mesmo catalisador por 5 vezes após a centrifugação da suspensão (catalisador/ solução), sem lavagens e/ou calcinação. Ao término das reações, a suspensão reacional foi filtrada para a separação da suspensão reacional/catalisador. À mistura obtida foi adicionado 2g de sulfato de sódio anidro para a remoção parcial de água e novamente foi filtrada. Todas as amostras foram armazenadas a 15°C até o momento da análise por CG-FID em coluna capilar Carbowax.

**CARACTERÍSTICAS DOS CATALISADORES:** A zeólita H-BEA tem um tamanho bem uniforme e em torno de 10µm, já a zeólita H-FER possui uma distribuição de tamanho de partículas menos uniforme, tendo partículas de tamanho entre 10µm, 70µm e 400µm. As Tabelas 1, 2 e 3 mostram as características de textura e acidez dos catalisadores H-BEA e H-FER.

RESULTADOS	H-BEA	H-FER
Área <sub>BET</sub> [m <sup>2</sup> /g]	535	328
Área <sub>MICROPOROS</sub> [m <sup>2</sup> /g]	337	309
Área <sub>EXTERNA</sub> [m <sup>2</sup> /g]	198	19,0
Volume <sub>TOTAL</sub> [cm <sup>3</sup> /g]	0,56	0,18
Volume <sub>MICROPOROS</sub> [cm <sup>3</sup> /g]	0,15	0,15
Volume <sub>BJH/DES</sub> [cm <sup>3</sup> /g]	0,53	0,04
Tamanho médio de poros <sub>BET</sub> [nm]	4,20	2,20
Tamanho médio de poros <sub>BJH/DES</sub> [nm]	13,6	7,70

Tabela 1 - Características texturais dos catalisadores H-BEA e H-FER obtidos pela técnica de Sorção de N<sub>2</sub>.

Catalisador	Acidez (mmol <sub>NH3</sub> /g <sub>Cat</sub> )			F/f*
	Sítios fracos	Sítios Fortes	Acidez Total	
H-BEA	0,16	1,09	1,25	6,81
H-FER	0,25	0,73	0,98	2,92

Tabela 2 – Características da acidez dos catalisadores: quantidade de Sítios fracos, Fortes e Acidez Total.

\*Razão Sítios Fortes:Sítios fracos.

T (°C)	Concentração de sítios ácidos (μmol <sub>PY</sub> /g <sub>Cat</sub> )					
	H-BEA			H-FER		
	Brönsted	Lewis	B/L*	Brönsted	Lewis	B/L*
150	60,4	33,66	1,79	49,73	3,78	13,16
250	39,26	58,14	0,67	60,4	4,59	13,16
350	24,16	45,9	0,53	51,34	4,59	11,18

Tabela 3 – Tipo de sítios ácidos presentes nos catalisadores em μmol piridina/g de catalisador: sítios ácidos de Brönsted (B) e sítios ácidos de Lewis (L), medidos a a 150 °C.

\*B/L: Razão da concentração dos sítios ácidos de Brönsted/sítios ácidos de Lewis.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

Ao fazer uma análise da Figura 2, percebe-se que o catalisador H-BEA foi o que proporcionou melhores resultados de conversão de glicerol (X<sub>A</sub>) atingindo 74,17% aos 180min. Já o catalisador H-FER finaliza a reação com conversão (X<sub>A</sub>) 57,07% para o glicerol.

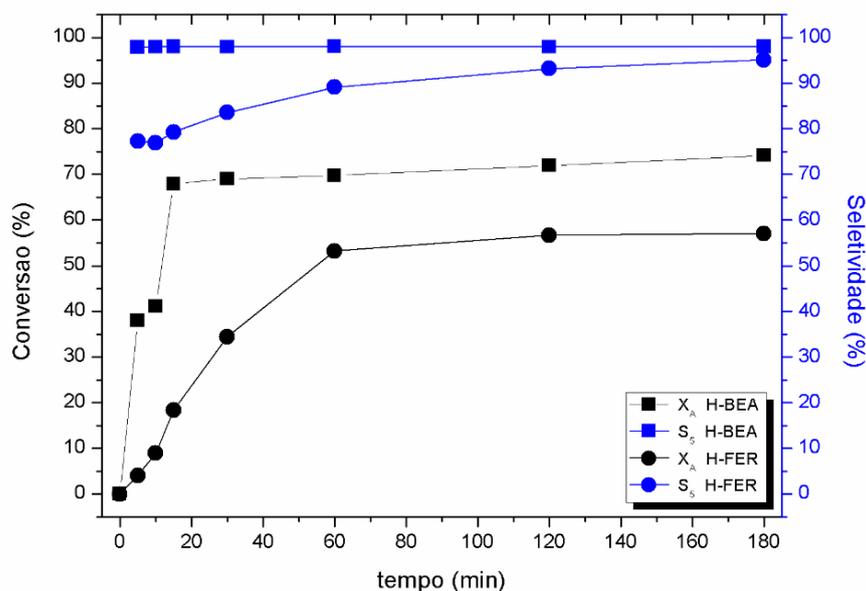


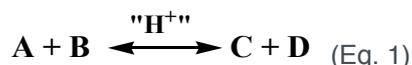
Figura 2. Curva cinética ( $X_A$  versus  $t$ ) e seletividade à Solketal encontrada para os catalisadores H-BEA e H-FER.

A Figura 2 mostra que o catalisador mais seletivo à Solketal ( $S_5$ ) foi a zeólita H-BEA apresentando valores praticamente constante, em média 97,94%, durante todo o processo. Já a seletividade da zeólita H-FER na produção de Solketal ( $S_5$ ) mostrou-se bastante instável, variando entre 77,30 e 95,13% durante o processo.

Para a determinação das constantes cinéticas considerou-se os reagentes glicerol e acetona e como produtos somente o Solketal e a água, o produto dioxana (anel de 6 membros) foi considerado insignificante para esta etapa, em função do baixo rendimento e seletividade.

• MODELAGEM CINÉTICA HETEROGÊNEA:

A reação química que representa a reação de cetalização do glicerol com acetona foi dada por:



Onde **A**, **B**, **C** e **D** correspondem respectivamente ao glicerol, à acetona, ao Solketal e à água. O “**H<sup>+</sup>**” refere-se aos sítios ácidos do catalisador heterogêneo.

O estudo cinético em catálise heterogênea é composto por sete etapas:

1. Difusão dos reagentes do seio do fluido até a superfície externa do catalisador;
2. Difusão dos reagentes da superfície externa do catalisador para o interior dos poros;
3. Adsorção química ou física dos reagentes;
4. Reação Química;
5. Dessorção dos produtos;
6. Difusão dos produtos do interior dos poros para a superfície externa do catalisador;
7. Difusão dos produtos da superfície externa do catalisador para o seio do

fluido.

As etapas 3, 4 e 5 são de natureza química dependem fundamentalmente da natureza do catalisador utilizado (H-BEA e H-FER). Enquanto que as etapas 1, 2, 6 e 7 que são totalmente de natureza física foram desprezadas.

Neste trabalho foram propostos dois mecanismos e estes mecanismos deram origem a 11 modelos cinéticos, criados com o auxílio software Maple 18, que tentam descrever o conjunto de transformações químicas e físicas que ocorrem na reação de cetalização do glicerol com acetona usando os catalisadores heterogêneos do tipo H-BEA e H-FER: A metodologia aplicada para definir os modelos cinéticos foi adaptada de HOUGEN (1959), ELEY (1940) e SHEKARA (2011). Através dos mecanismos de LHHW e ER é possível obter expressões que definem matematicamente o fator cinético, a força motriz e o termo de adsorção (Tabela 4-8) e com a Equação 2 pode-se construir os modelos que descrevem a taxa de reação,  $(-r_A)$ :

$$(-r_A) = \frac{(fator_{cinético}) \cdot (força_{motriz})}{(termo_{adsorção})^n} \quad (\text{Eq. 2})$$

Sendo  $n$ : expoente de adsorção.

Etapa Controladora	$f_c$
Adsorção de A	$k_A$
Adsorção de B	$k_B$
Dessorção de C	$K_C \cdot K$
Adsorção de A com dissociação de A	$k_A$
Reação Homogênea	$K$

Tabela 4 - Fator Cinético ( $f_c$ )

Etapa Controladora	$A \leftrightarrow C$	$A \leftrightarrow C + D$	$A + B \leftrightarrow C$	$A + B \leftrightarrow C + D$
Adsorção de A	$P_A - (P_C/K)$	$P_A - (P_C \cdot P_D/K)$	$P_A - (P_C/K \cdot P_B)$	$P_A - (P_C \cdot P_D/K \cdot P_B)$
Adsorção de B	0	0	$P_B - (P_C/K \cdot P_A)$	$P_B - (P_C \cdot P_D/K \cdot P_A)$
Dessorção de C	$P_A - (P_C/K)$	$P_A/P_D - (P_C/K)$	$P_A \cdot P_B - (P_C/K)$	$P_A \cdot P_B/P_D - (P_C/K)$
Reação Química	$P_A - (P_C/K)$	$P_A - (P_C \cdot P_D/K)$	$P_A \cdot P_B - (P_C/K)$	$P_A \cdot P_B - (P_C \cdot P_D/K)$
Reação Homogênea	$P_A - (P_C/K)$	$P_A - (P_C \cdot P_D/K)$	$P_A \cdot P_B - (P_C/K)$	$P_A \cdot P_B - (P_C \cdot P_D/K)$

Tabela 5 - Força Motriz.

Etapa Controladora	$A \leftrightarrow C$	$A \leftrightarrow C + D$	$A + B \leftrightarrow C$	$A + B \leftrightarrow C + D$
Adsorção de A $K_A \cdot P_A$ é substituído por	$K_A \cdot P_C/K$	$K_A \cdot P_C \cdot P_D/K$	$K_A \cdot P_C/K \cdot P_B$	$K_A \cdot P_C \cdot P_D/K \cdot P_B$
Adsorção de B $K_B \cdot P_B$ é substituído por	0	0	$K_B \cdot P_C/K \cdot P_A$	$K_B \cdot P_C \cdot P_D/K \cdot P_A$
Dessorção de C $K_C \cdot P_C$ é substituído por	$K \cdot K_C \cdot P_A$	$K \cdot K_C \cdot P_A/P_D$	$K \cdot K_C \cdot P_A \cdot P_B$	$K \cdot K_C \cdot P_A \cdot P_B/P_D$
Adsorção de A com dissociação de A $K_A \cdot P_A$ é substituído por	$(K_A \cdot P_C/K)^{1/2}$	$(K_A \cdot P_C \cdot P_D/K)^{1/2}$	$(K_A \cdot P_C/K \cdot P_B)^{1/2}$	$(K_A \cdot P_C \cdot P_D/K \cdot P_B)^{1/2}$
Quando A não é adsorvido $K_A \cdot P_A$ é substituído por (similar para B, C ou D)	0	0	0	0

Tabela 6 - Determinação do termo de adsorção geral:  $(1 + K_A \cdot P_A + K_B \cdot P_B + K_C \cdot P_C + K_D \cdot P_D + K_T \cdot P_T)^n$ .

T = Intermediário formado.

Etapa Controladora	A ↔ C	A ↔ C + D	A + B ↔ C	A + B ↔ C + D
Sem dissociação	$k \cdot K_A$	$k \cdot K_A$	$k \cdot K_A \cdot K_B$	$k \cdot K_A \cdot K_B$
Com dissociação de A	$k \cdot K_A$	$k \cdot K_A$	$k \cdot K_A \cdot K_B$	$k \cdot K_A \cdot K_B$
Sem adsorção de B	$k \cdot K_A$	$k \cdot K_A$	$k \cdot K_A$	$k \cdot K_A$
Sem adsorção de B e dissociação de A	$k \cdot K_A$	$k \cdot K_A$	$k \cdot K_A$	$k \cdot K_A$

Tabela 7 - Quando a etapa controladora é a reação química, fator cinético ( $f_c$ )

Etapa Controladora	A ↔ C	A ↔ C + D	A + B ↔ C	A + B ↔ C + D
Adsorção de A sem dissociação	1	1	1	1
Dessorção de C	1	1	1	1
Adsorção de A com dissociação	2	2	2	2
Reação Química sem dissociação de A	1	2	2	2
Reação Química com dissociação de A	2	2	3	3
Reação Química sem dissociação de A (Sem adsorção de B)	0	-	1	2
Reação Química com dissociação de A (Sem adsorção de B)	-	-	2	2

Tabela 8 - Expoente de adsorção ( $n$ )

Sendo:

- $(-r_A)$ : Taxa de reação, [ $\text{mol gcat}^{-1} \text{min}^{-1}$ ];
- $P_A, P_B, P_C$  e  $P_D$ : Pressão parcial de cada componente (A, B, C e D), [atm];
- $k$ : Coeficiente cinético, [ $\text{mol gcat}^{-1} \text{min}^{-1}$ ];
- $K$ : Constante de equilíbrio da reação, adimensional;
- $K_A, K_B, K_C$  e  $K_D$ : Constante de reação de cada componente (A, B, C e D), [ $\text{atm}^{-1}$ ];
- $k_A, k_B, k_C, k_D$ : Coeficiente cinético de cada componente (A, B, C e D), [ $\text{mol gcat}^{-1} \text{min}^{-1} \text{atm}^{-1}$ ].

(HOUGEN & WATSON, 1959)

A seguir será detalhado o procedimento utilizado para a substituição dos termos cinéticos, potencial e de adsorção na Equação 3, obtidos das Tabelas 4-8, segundo as condições assumidas para cada modelo. Para a criação dos modelos as pressões ( $P_A, P_B, P_C$  e  $P_D$ ) foram substituídas pelas concentrações molares ( $C_A, C_B, C_C$  e  $C_D$ ), seguindo este raciocínio:

$$C_i = \frac{P_i}{R \cdot T} \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde  $C_i$  é a concentração molar (mol/L) da espécie  $i = A, B, C \text{ e } D$ .  $P_i$  é a pressão parcial (atm) da espécie  $i = A, B, C \text{ e } D$ .  $R$  é a constante dos gases e igual a 0,082 atm L/mol K e  $T$  é a temperatura em Kelvin (K).

Neste trabalho os dados foram obtidos em termos de conversão de glicerol ( $X_A$ ), então como no início da reação não há produtos, considerou-se que:

$$C_A = C_{A0} \cdot (1 - X_A) \quad (\text{Eq.4})$$

$$C_B = C_{B0} - (C_{A0} \cdot X_A) \quad (\text{Eq. 5})$$

$$C_C = C_{A0} \cdot X_A \quad (\text{Eq. 6})$$

$$C_D = C_{A0} \cdot X_A \quad (\text{Eq. 7})$$

Considerando que não existem produtos no início da reação, ou seja,  $C_{C0} = C_{D0} = 0$ , e sabendo-se que se tratando de cinética heterogênea para um reator batelada se cumpre que:

$$(-r_A) = \frac{C_{A0}}{W_{Cat}} \left( \frac{dX_A}{dt} \right) \quad (\text{Eq. 8})$$

Se obtém para cada modelo a equação da taxa de reação como função da conversão do glicerol ( $X_A$ ), onde  $W_{Cat}$  (g) corresponde a massa de catalisador utilizada, neste caso 2 g e  $t$  é o tempo (min).

**1) Mecanismo de Eley-Rideal.** Este mecanismo sugere que somente um dos reagentes se adsorva na superfície do catalisador e reaja com o outro reagente que não foi adsorvido, presente na fase líquida. Esse mecanismo consiste em 3 etapas: na primeira ocorre a adsorção de um dos reagentes ou glicerol (A) ou acetona (B) nos sítios ativos; na etapa 2 ocorre a reação química entre a acetona (B) ou glicerol (A) adsorvido, sendo que somente um dos reagentes se adsorve (A) ou (B), enquanto o outro (B) ou (A) está presente na fase líquida e por fim a dessorção do produto que foi formado nos sítios catalíticos, Solketal (C) ou Água (D), sendo que somente um se dessorve enquanto o outro está presente a fase líquida.

# **Modelo 1:** Reação reversível, sem dissociação dos reagentes (A e B), etapa controladora: adsorção do glicerol (A);

$$\frac{C_{A0}}{W_{Cat}} \left( \frac{dX_A}{dt} \right) = (r_{ad,A}) = \frac{k_{ad,A} \cdot (C_{A0} \cdot (1 - X_A)) - \frac{(C_{A0} \cdot X_A)^2}{K \cdot C_{A0} \cdot (M - X_A)}}{1 + \frac{K_A \cdot (C_{A0} \cdot X_A)^2}{K \cdot C_{A0} \cdot (M - X_A)} + K_C \cdot C_{A0} \cdot X_A} \quad (\text{Eq. 9})$$

# **Modelo 2:** Reação reversível, sem dissociação dos reagentes (A e B), etapa controladora: adsorção da acetona (B);

$$\frac{C_{A0}}{W_{Cat}} \left( \frac{dX_A}{dt} \right) = (r_{ad,B}) = \frac{k_{ad,B} \cdot (C_{A0} \cdot (M - X_A)) - \frac{C_{A0} \cdot X_A^2}{K \cdot (1 - X_A)}}{1 + \frac{K_B \cdot C_{A0} \cdot X_A^2}{K \cdot (1 - X_A)} + K_D \cdot C_{A0} \cdot X_A} \quad (\text{Eq. 10})$$

# **Modelo 3:** Reação reversível, sem dissociação dos reagentes (A e B), etapa controladora: reação química entre o glicerol (A) adsorvido na superfície do catalisador com a acetona (B) presente na fase líquida;

$$\frac{C_{A0}}{W_{Cat}} \left( \frac{dX_A}{dt} \right) = (r_{rs,AX}) = \frac{k_{rs,AX} \cdot K_A \cdot (C_{A0} \cdot (1 - X_A)) \cdot C_{A0} \cdot (M - X_A) - \frac{(C_{A0} \cdot X_A)^2}{K}}{(1 + K_A \cdot C_{A0} \cdot (1 - X_A)) + K_C \cdot C_{A0} \cdot X_A^2} \quad (\text{Eq. 11})$$

# **Modelo 4:** Reação reversível, sem dissociação dos reagentes (A e B), etapa controladora: reação química entre a acetona (B) adsorvida na superfície do catalisador com o glicerol (A) presente na fase líquida;

$$\frac{C_{A0}}{W_{Cat}} \left( \frac{dX_A}{dt} \right) = (r_{rs,B,X}) = \frac{k_{rs,B,X} \cdot K_A (C_{A0} \cdot (1 - X_A) \cdot C_{A0} \cdot (M - X_A) - \frac{C_{A0} \cdot X_A^2}{K}}{(1 + K_B \cdot C_{A0} \cdot (M - X_A) + K_D \cdot C_{A0} \cdot X_A)^2} \quad (\text{Eq. 12})$$

# **Modelo 5:** Reação reversível, sem dissociação dos reagentes (A e B), etapa controladora: dessorção do Solketal (C);

$$\frac{C_{A0}}{W_{Cat}} \left( \frac{dX_A}{dt} \right) = (r_{des,C}) = \frac{k_{des,C} \left( \frac{(1 - X_A) \cdot C_{A0} \cdot (M - X_A)}{X_A} - \frac{C_{A0} \cdot X_A}{K} \right)}{(1 + K_A \cdot C_{A0} \cdot (1 - X_A) + K \cdot K_C \left( \frac{(1 - X_A) \cdot C_{A0} \cdot (M - X_A)}{X_A} \right))} \quad \text{Eq. 13}$$

# **Modelo 6:** Reação reversível, sem dissociação dos reagentes (A e B), etapa controladora: dessorção da água (D);

$$\frac{C_{A0}}{W_{Cat}} \left( \frac{dX_A}{dt} \right) = (r_{des,D}) = \frac{k_{des,D} \left( \frac{(1 - X_A) \cdot C_{A0} \cdot (M - X_A)}{X_A} - \frac{C_{A0} \cdot X_A}{K} \right)}{(1 + K_B \cdot C_{A0} \cdot (M - X_A) + K \cdot K_D \left( \frac{(1 - X_A) \cdot C_{A0} \cdot (M - X_A)}{X_A} \right))} \quad (\text{Eq. 14})$$

**2) Mecanismo de Langmuir-Hinshelwood-Hougen-Watson (LHHW).** Este mecanismo propõe que a reação de cetalização do glicerol consiste em três etapas: na primeira ocorre a adsorção do glicerol (A) e da acetona (B) nos sítios ativos; na segunda etapa ocorre a reação química entre os reagentes, glicerol (A) e a acetona (B), na superfície em que o Solketal (C) e água (D) são formados; na última etapa ocorre a dessorção do Solketal (C) e da água (D).

# **Modelo 7:** Reação reversível, sem dissociação dos reagentes (A e B), etapa controladora: adsorção do glicerol (A);

$$\frac{C_{A0}}{W_{Cat}} \left( \frac{dX_A}{dt} \right) = (r_{AD,A}) = \frac{k_{AD,A} \left( C_{A0} \cdot (1 - X_A) - \frac{C_{A0} \cdot X_A^2}{K \cdot C_{A0} \cdot (M - X_A)} \right)}{\left( 1 + \frac{K_A \cdot (C_{A0} \cdot X_A)^2}{K \cdot C_{A0} \cdot (M - X_A)} + K_B \cdot C_{A0} \cdot (M - X_A) + K_C \cdot C_{A0} \cdot X_A + K_D \cdot C_{A0} \cdot X_A \right)} \quad (\text{Eq. 15})$$

# **Modelo 8:** Reação reversível, sem dissociação dos reagentes (A e B), etapa controladora: adsorção da acetona (B);

$$\frac{C_{A0}}{W_{Cat}} \left( \frac{dX_A}{dt} \right) = (r_{AD,B}) = \frac{k_{AD,B} \left( C_{A0} \cdot (M - X_A) - \frac{C_{A0} \cdot X_A^2}{K \cdot (1 - X_A)} \right)}{\left( 1 + K_A \cdot C_{A0} \cdot (1 - X_A) + \frac{K_B \cdot C_{A0} \cdot X_A^2}{K \cdot (1 - X_A)} + K_C \cdot C_{A0} \cdot X_A + K_D \cdot C_{A0} \cdot X_A \right)} \quad (\text{Eq. 16})$$

# **Modelo 9:** Reação reversível, sem dissociação dos reagentes (A e B), etapa controladora: reação química entre o glicerol (A) e a acetona (B), ambos adsorvidos na superfície do catalisador;

$$\frac{C_{A0}}{W_{Cat}} \left( \frac{dX_A}{dt} \right) = (r_{RS}) = \frac{k_{RS} \cdot K_A \cdot K_B \left( C_{A0} \cdot (1 - X_A) \cdot C_{A0} \cdot (M - X_A) - \frac{(C_{A0} \cdot X_A)^2}{K} \right)}{\left( 1 + K_A \cdot C_{A0} \cdot (1 - X_A) + K_B \cdot C_{A0} \cdot (M - X_A) + K_C \cdot (C_{A0} \cdot X_A) + K_D \cdot (C_{A0} \cdot X_A) \right)^2} \quad (\text{Eq. 17})$$

# **Modelo 10:** Reação reversível, sem dissociação dos reagentes (A e B), etapa controladora: dessorção do Solketal (C);

$$\frac{C_{A0}}{W_{Cat}} \left( \frac{dX_A}{dt} \right) = (r_{DES,C}) = \frac{k_{DES,C} \left( \frac{(1 - X_A) \cdot C_{A0} \cdot (M - X_A)}{X_A} - \frac{C_{A0} \cdot X_A}{K} \right)}{\left( 1 + K_A \cdot C_{A0} \cdot (1 - X_A) + K_B \cdot C_{A0} \cdot (M - X_A) + \frac{K_C \cdot K_C \cdot (1 - X_A) \cdot C_{A0} \cdot (M - X_A)}{X_A} + K_D \cdot C_{A0} \cdot X_A \right)} \quad (\text{Eq. 18})$$

# **Modelo 11:** Reação reversível, sem dissociação dos reagentes (A e B), etapa controladora: dessorção da água (D);

$$\frac{C_{A0}}{W_{Cat}} \left( \frac{dX_A}{dt} \right) = (r_{DES,D}) = \frac{k_{DES,D} \left( \frac{(1 - X_A) \cdot C_{A0} \cdot (M - X_A)}{X_A} - \frac{C_{A0} \cdot X_A}{K} \right)}{\left( 1 + K_A \cdot C_{A0} \cdot (1 - X_A) + K_B \cdot C_{A0} \cdot (M - X_A) + K_C \cdot C_{A0} \cdot X_A + K \cdot K_D \left( \frac{(1 - X_A) \cdot C_{A0} \cdot (M - X_A)}{X_A} \right) \right)} \quad (\text{Eq. 19})$$

Onde  $C_{A0}$  é a concentração molar da glicerina (mol/L),  $M$  (adimensional) é o quociente entre a concentração molar da acetona  $C_{B0}$  (10,91 mols/L) e a concentração molar do glicerol  $C_{A0}$  (2,71 mols/L),  $M = C_{B0}/C_{A0}$ .

Os parâmetros  $K_A$ ,  $K_B$ ,  $K_C$  e  $K_D$  (L/mol) são as constantes de equilíbrio de adsorção dos reagentes A (glicerol), B (acetona) e dos produtos C (Solketal) e D (água).  $K$  (adimensional) é a constante de equilíbrio da superfície. Já as representações  $k_{ad,A}$ ;  $k_{ad,B}$ ;  $k_{rs,A,X}$ ;  $k_{rs,B,X}$ ;  $k_{des,C}$ ;  $k_{des,D}$ ;  $k_{AD,A}$ ;  $k_{AD,B}$ ;  $k_{RS}$ ;  $k_{DES,C}$ ;  $k_{DES,D}$  são referentes à constante cinética,  $k$ , ( $\text{g}_{Cat} \text{L mol}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) referente a cada modelo criado. Enquanto  $r_{ad,A}$ ;  $r_{ad,B}$ ;  $r_{rs,A,X}$ ;  $r_{rs,B,X}$ ;  $r_{des,C}$ ;  $r_{des,D}$ ;  $r_{AD,A}$ ;  $r_{AD,B}$ ;  $r_{RS}$ ;  $r_{DES,C}$ ;  $r_{DES,D}$  corresponde à taxa de reação ( $\text{mol L}^{-1} \text{g}_{Cat}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) de cada modelo criado.

Os resultados dos parâmetros cinéticos para cada mecanismo e modelos criados foram estimados através da regressão não-linear, utilizando o software STATISTICA 12.0 são apresentados nas Tabelas 9 (ER) e 10 (LHHW).

H-BEA		Etapa Controladora				
Parâmetros Cinéticos	ad, A	ad, B	rs, A.X	rs, B.X	des, C	des, D
Mecanismo: ER	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Modelo 4	Modelo 5	Modelo 6
$k$ ( $\text{g}_{Cat} \text{L mol}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	3,79E-02	<b>9,42E-03</b>	-1,47E-02	<b>4,73E-01</b>	nc	nc
K	5,81E-01	<b>5,81E-01</b>	5,95E-01	<b>5,95E-01</b>	nc	nc
$K_A$ (L/mol)	-7,49E-01	----	-1,13E-01	----	nc	nc
$K_B$ (L/mol)	----	<b>2,07E-01</b>	----	<b>8,82E-03</b>	nc	nc
$K_C$ (L/mol)	5,32E-01	----	-3,10E-02	----	nc	nc
$K_D$ (L/mol)	----	<b>8,10E-01</b>	----	<b>1,39E-01</b>	nc	nc
R <sup>2</sup>	0,88759	<b>0,8876</b>	0,8872	<b>0,8872</b>	nc	nc
Q	0,002416	<b>0,002416</b>	0,002424	<b>0,002424</b>	nc	nc
H-FER		Etapa Controladora				
Parâmetros Cinéticos	ad, A	ad, B	rs, A.X	rs, B.X	des, C	des, D
Mecanismo: ER	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Modelo 4	Modelo 5	Modelo 6

$k$ ( $g_{\text{Cat}} \text{ L mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$ )	3,73E-03	9,27E-04	-4,57E-02	9,84E-02	nc	nc
K	1,54E+04	4,91E+04	2,39E-01	2,39E-01	nc	nc
$K_A$ (L/mol)	9,92E+05	----	-1,13E-02	----	nc	nc
$K_B$ (L/mol)	----	6,53E+05	----	1,31	nc	nc
$K_C$ (L/mol)	-4,04	----	-1,68E-01	----	nc	nc
$K_D$ (L/mol)	----	-3,76	----	-1,17	nc	nc
$R^2$	0,93457	0,9346	0,8224	0,8224	nc	nc
Q	0,000062	0,000062	0,000159	0,000159	nc	nc

Tabela 9 - Resultados dos Parâmetros de Ajuste estimados para a reação de cetalização do glicerol com acetona pelo mecanismo ER, considerando os onze modelos propostos, com o uso dos catalisadores H-BEA e H-FER. Condições: 700 rpm; razão molar 1:4 (G:A); 5 % de catalisador em relação à massa de glicerol; 180 min.

nc: não convergiu.

H-BEA		ETAPA CONTROLADORA			
Parâmetros Cinéticos	ADS, A	ADS, B	RS	DES, C	DES, D
Mecanismo: LHHW	Modelo 7	Modelo 8	Modelo 9	Modelo 10	Modelo 11
$k$ ( $g_{\text{Cat}} \text{ L mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$ )	7,98E-02	<b>8,61E+02</b>	<b>4,04E+05</b>	nc	nc
K	5,81E-01	<b>5,75E-01</b>	<b>5,78E-01</b>	nc	nc
$K_A$ (L/mol)	-1,58	<b>3,37E+04</b>	<b>3,08E-01</b>	nc	nc
$K_B$ (L/mol)	1,01E-01	<b>1,19E+04</b>	<b>3,05E+05</b>	nc	nc
$K_C$ (L/mol)	6,11E-01	<b>5,81E+04</b>	<b>2,97E+05</b>	nc	nc
$K_D$ (L/mol)	6,11E-01	<b>5,81E+04</b>	<b>2,97E+05</b>	nc	nc
$R^2$	0,88759	<b>0,8875</b>	<b>0,8868</b>	nc	nc
Q	0,002416	<b>0,002419</b>	<b>0,002433</b>	nc	nc

H-FER		ETAPA CONTROLADORA			
Parâmetros Cinéticos	ADS, A	ADS, B	RS	DES, C	DES, D
Mecanismo: LHHW	Modelo 7	Modelo 8	Modelo 9	Modelo 10	Modelo 11
$k$ ( $g_{\text{Cat}} \text{ L mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$ )	1,86E-04	2,17E-05	1,46E-01	nc	nc
K	3,38E-01	1,13	2,98E-01	nc	nc
$K_A$ (L/mol)	1,09	-3,60E-01	1,91E-01	nc	nc
$K_B$ (L/mol)	-8,71E-02	3,45E-01	2,39E-01	nc	nc
$K_C$ (L/mol)	-1,45E-01	-2,24E-01	-7,05E-02	nc	nc
$K_D$ (L/mol)	-1,45E-01	-2,24E-01	-7,05E-02	nc	nc
$R^2$	0,92846	0,9328	0,8224	nc	nc
Q	0,000068	0,000064	0,000159	nc	nc

Tabela 10 - Resultados dos Parâmetros de Ajuste estimados para a reação de cetalização do glicerol com acetona pelo mecanismo LHHW, considerando os onze modelos propostos, com o uso dos catalisadores H-BEA e H-FER. Condições: 700 rpm; razão molar 1:4 (G:A); 5 % de catalisador em relação à massa de glicerol; 180 min.

nc: não convergiu.

Para avaliar a adequabilidade dos modelos propostos considerou-se, primeiramente, o realismo físico dos parâmetros estimados através da regressão não-linear. Isto implica em dizer que os modelos nos quais foram obtidos valores negativos para os parâmetros  $K; K_A; K_B; K_C; K_D; k_{ad, A}; k_{ad, B}; k_{rs, A, X}; k_{rs, B, X}; k_{des, C}; k_{des, D}; k_{AD, A}; k_{AD, B}; k_{RS}; k_{DES, C}$  e  $k_{DES, D}$  foram descartados. A partir desta designação, algoritmos de convergência disponíveis no software STATISTICA 12.0 foram testados para um mesmo modelo, dos quais o Quase-Newton foi o que melhor conseguiu minimizar o valor da soma dos

resíduos quadrados (Q), que é a diferença ao quadrado entre os valores das taxas de reação experimental e das taxas de reação calculadas pelos modelos.

Ao observar as Tabelas 9 e 10 verificou-se que os modelos heterogêneos criados somente podem descrever a cinética da reação heterogênea para o catalisador H-BEA, pois para o catalisador H-FER todos os 11 modelos resultaram em um ou mais valores negativos para seus parâmetros, sendo assim descartados.

Para estimar mecanismo e o modelo adequado para as reações empregando H-BEA foi realizada uma análise com base na observação dos coeficientes de variação,  $R^2$ , que mede a qualidade da confiança que pode ser depositada na equação de regressão obtida como instrumento de precisão, gerando resultados confiáveis se próximos ou iguais a 1.

Para o mecanismo de Eley-Rideal as etapas: ADSORÇÃO DE (B) ACETONA ( $R^2=0,8876$ ) e REAÇÃO QUÍMICA COM SOMENTE (B) ACETONA SE ADSORVENDO NA SUPERFÍCIE DO CATALISADOR ( $R^2 = 0,8872$ ) podem explicar os fenômenos que ocorrem quando usa-se H-BEA como catalisador na reação de cetalização do glicerol com acetona e serem admitidas como as possíveis etapas controladoras.

Para o mecanismo de Langmuir-Hinshelwood-Hougen-Watson as etapas: ADSORÇÃO DE (B) ACETONA ( $R^2 = 0,8875$ ) e REAÇÃO QUÍMICA ENTRE OS REAGENTES (A) GLICEROL e ACETONA (B) ADSORVIDOS NA SUPERFÍCIE DO CATALISADOR ( $R^2 = 0,8868$ ), podem ser admitidas como as possíveis etapas controladoras.

Pode-se dizer que existem 4 modelos cinéticos que possuem bons ajustes para o catalisador H-BEA:

- Modelos 2 e 4 do mecanismo de ER;
- Modelos 8 e 9 do mecanismo de LHHW.

Estudos sobre a cinética da reação de cetalização do glicerol com acetona utilizando catalisadores heterogêneos foram realizados pelo grupo de Nanda (2014) e pelo grupo de Esteban (2015).

Nanda (2014) utilizou a resina Amberlyst 35 como catalisador e utilizou o modelo de LHHW para descrever a reação de cetalização do glicerol com acetona, sendo a reação química a etapa limitante e representa, com a adequação dos dados apresentados neste trabalho, um modelo plausível. Porém, o modelo de ER parece ser o mais plausível. O grupo de Esteban (2015) chegou a essa mesma conclusão e a possível explicação é de que o modelo de LHHW envolve a adsorção do glicerol em direção a um sítio ativo que já contém uma molécula de acetona adsorvida. Isto é muito menos provável de acontecer devido a estrutura da molécula de glicerol ter menos afinidade, em comparação a molécula de acetona, com o sítio ativo das zeólitas. Além disso, o excesso de acetona (4:1 molar) presente no meio reacional diminui a possibilidade da adsorção do glicerol junto à acetona no sítio ativo ou catalítico da zeólita H-BEA.

A aplicação de modelagem molecular computacional para o estudo do mecanismo da reação de cetalização do glicerol com acetona, utilizando H-BEA e H-FER como catalisadores, permitiria confirmar tanto os mecanismos, como as etapas controladoras, para este caso.

- REUSO DO CATALISADOR H-BEA:

Foram realizados os experimentos de reuso para o catalisador H-BEA nas condições ótimas, encontradas pelo planejamento experimental. Condições: 700 rpm; razão molar 1:4 (G:A); 5 % de catalisador em relação à massa de glicerol; 60 °C; 60 min. Para a realização destes experimentos, no final da reação, o catalisador foi apenas separado da solução reacional por filtração e logo em seguida foi reutilizado por mais quatro vezes, da mesma maneira.

O motivo pelo qual optou-se em proceder os testes de reuso sem a necessidade de pré-tratamentos (lavagem e calcinação) para o catalisador entre uma reação e outra foi para evitar o tempo morto entre uma reação e outra. Pois, industrialmente, não é viável parar a produção para lavar e calcinar o catalisador a cada 60 min, visto que o estudo se trata de um reator batelada.

O catalisador H-BEA em sua primeira utilização apresenta uma excelente conversão de glicerol para a reação de cetalização do glicerol com acetona, atingindo aproximadamente 70 % de conversão de glicerol. Da primeira reutilização até a terceira a conversão de glicerol cai e atinge 50 %, em média. Se mantendo praticamente constante, com conversão semelhante à conversão obtida pela indústria, 52,55 %, ao utilizar o catalisador homogêneo (PTSA). Porém, a partir da quinta reação a conversão de glicerol cai muito, convertendo somente 21,61 % do glicerol alimentado no reator. A seletividade à Solketal,  $S_5$ , se mantém constante em todo o processo  $\approx 98$  %.

Mesmo que os catalisadores ácidos possuam alta atividade podem ser desativados pelo bloqueio dos sítios ativos por moléculas de água formadas durante a reação, acrescentam os grupos de Silva (2011) e Sandesh (2015). Quanto maior for à hidrofobicidade do catalisador menor será o número de sítios ácidos. No entanto, os grupos hidrofóbicos atuam na interface glicerol-acetona, reduzindo a interferência de moléculas de água na superfície do catalisador. (SILVA et al., 2011; SANDESH et al., 2015)

De acordo com a literatura, tanto os sítios ácidos de Lewis como os de Brønsted são ativos para a reação de cetalização do glicerol com acetona. (GADAMSETTI et al., 2015 ; SANDESH et al., 2015; KOWALSKA-KUS et al., 2016; NANDA et al., 2016 ; ROSSA et al., 2017 ; STAWICKA et al., 2016).

O grupo de Stawicka (2016) concluiu que os sítios ácidos de Brønsted foram os mais eficientes, quando comparado aos sítios ácidos de Lewis ou uma mistura de sítios ácidos Brønsted-Lewis. (STAWICKA et al., 2016)

Já se tratando de catálise homogênea de acordo com Li (2012) os ácidos de Lewis foram muito mais eficientes do que os ácidos de Brønsted. (LI et al., 2012)

Neste trabalho, a concentração de sítios ácidos de Brønsted e de Lewis foram muito maiores para o catalisador H-BEA do que para o catalisador H-FER. Ambas às naturezas de sítios foram determinantes para a reação ocorrer. Portanto, as variáveis: maior força ácida e natureza mista de sítios ácidos de Brønsted e Lewis também contribuíram para que a zeólita H-BEA fosse o catalisador mais ativo.

Stawicka (2016) sugere que a seletividade à solketal se deve aos sítios ácidos de Brønsted, sendo estes os mais eficientes para a seletividade.

A área específica, área externa, volume total (micro + meso) e a distribuição de tamanho de poros, também são muito superiores para a zeólita H-BEA se comparado com a zeólita H-FER

O mesmo comportamento é observado em ROSSA (2017) na desativação ou perda de atividade catalítica da zeólita H-BEA, ao fim dos experimentos de reuso, com a perda das características texturais e de cristalinidade do catalisador se comparado ao seu estado íntegro. (ROSSA et al., 2017)

Todas estas características corroboraram para que a zeólita H-BEA fosse o catalisador mais ativo na reação de cetalização do glicerol com acetona.

Uma outra abordagem, em termos de Frequência de Turnover (*TOF/Turnover Frequency*), foi realizada para estudar a atividade catalítica dos catalisadores utilizados neste trabalho.

Em catálise ácida, mais especificamente na reação de cetalização de glicerol, o TOF representa o número de mols de glicerol convertidos (ou mols de Solketal formados) por mols de sítios ácidos no catalisador, por hora. Os valores de TOF para os catalisadores H-BEA, H-FER e PTSA foram calculados a partir da Equação 20.

$$TOF = \frac{\left( \frac{N_c}{N_{Cat}} \right)}{t} \quad (\text{Eq. 20})$$

Sendo:

- $N_c$ , a quantidade de matéria de Solketal produzido (mol);
- $N_{Cat}$  a quantidade de matéria de catalisador ou de sítios ácidos (mol);
- $t$ , o tempo em horas (h);
- $TOF$ , a Frequência de Turnover ( $h^{-1}$ ).

Os valores de TOF para cada catalisador e mais detalhes são apresentados na Tabela 11, a quantidade de matéria referente aos sítios ácidos dos catalisadores heterogêneos foram mensurados pela análise de TPD-NH<sub>3</sub>.

Catalisadores	mol <sub>Cat</sub>	TOF		
		1 h	2 h	3 h
H-BEA	0,0025	119,22	61,46	42,25
H-FER	0,0020	103,27	57,07	39,53

Tabela 11 – Mais detalhes para os cálculos de TOF.

O valor de TOF tende a diminuir com o passar do tempo, isso é explicado pela perda de atividade do catalisador ou também pela reação ter chegado ao seu equilíbrio, para o caso de reações reversíveis. O maior valor de TOF foi de  $119,22 \text{ h}^{-1}$ , obtido pelo catalisador H-BEA, após 1 hora de reação. Já o menor valor de TOF foi de  $39,53 \text{ h}^{-1}$ , obtido pelo catalisador H-FER, após 3 hora de reação. O catalisador H-BEA continua sendo o mais apropriado, por todas as suas características apresentadas neste trabalho.

## 4 | CONCLUSÕES

O catalisador H-BEA exibiu melhores resultados, aos 180min, para a conversão do glicerol ( $X_A=74,17\%$ ), e maior seletividade a Solketal ( $S_5 \approx 98,00 \%$ ) e, conseqüentemente, o maior rendimento de Solketal ( $R_5 = 72,66 \%$ ).

Dos 11 modelos criados para tentar explicar a reação de cetalização do glicerol com acetona só foram positivos para o catalisador H-BEA. Sendo que somente os modelos 2, 4, 8 e 9 podem ser empregados com maior confiança para supor o mecanismo e a etapa controladora da reação catalítica heterogênea.

O catalisador H-BEA pode ser reutilizado por 4 vezes consecutivas e não requer lavagens e tratamentos ao término de cada reação. Uma quinta reação poderá ser feita aumentando a temperatura de reação. É muito provável que de alguma forma a água formada durante a reação e/ou as impurezas dos reagentes, como resíduos de sódio no glicerol, tenham provocado a desestabilização da estrutura da zeólita H-BEA, alterando a sua cristalinidade após a quarta reação consecutiva.

Concluiu-se que para o catalisador apresentar a melhor atividade para a reação de cetalização do glicerol com acetona, em termos de conversão de glicerol o mesmo deve apresentar alta área B.E.T., SAR elevado, maior contribuição mesoporosa, menor tamanho cristalito e de partículas, possuir sítios com maior força ácida e de natureza tanto de Brønsted como de Lewis ou uma mistura Brønsted-Lewis de preferência com baixa razão B/L e possuir alta hidrofobicidade e alta estabilidade hidrotérmica.

Os resultados de atividade catalítica avaliados pela Frequência de Turnover (TOF) apontam que ambos os catalisadores heterogêneos apresentaram valores de TOF muito próximos, porém o melhor foi o H-BEA.

## REFERÊNCIAS

ELEY, D. D. and RIDEAL, E. K., **Parahydrogen Conversion on Tugnesten**, Nature, v. 146, n. 40, p. 401-402, 1940.

ESTEBAN, J.; LADERO, M.; GARCIA-OCHOA, F., **Kinetic modelling of the solventless synthesis of solketal with a sulphonic ion exchange resin**, Chemical Engineering Journal, v. 269 p. 194–202, 2015.

GADAMSETTI, S.; RAJAN, N. P.; RAO, G. S.; CHARY, K. V. R., **Acetalization of glycerol with**

**acetone to bio fuel additives oversupported molybdenum phosphate catalysts**, Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, v. 410, p. 49–57, 2015.

HOUGEN, O. A. and WATSON, K. M. **Chemical Process Principles Part Three 3, Kinetics and Catalysis**, New York: John Wiley, 1959.

KOWALSKA-KUS, J.; HELD, A.; NOWINSKA, K., **Enhancement of the catalytic activity of H-ZSM-5 zeolites for glycerol acetalization by mechanical grinding**, *Reac. Kinet. Mech. Cat.*, v. 117, p. 341–352, 2016.

LI, L., KORÁNYI, T. I.; SELS, B. F.; PESCARMONA, P. P., **Highly-efficient conversion of glycerol to solketal over heterogeneous Lewis acid catalysts**, *Green Chem.*, v. 14, p. 1611, 2012.

MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. X.; GONÇALVES, V. L. C., **Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel**. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 639-648, 2009.

NANDA, M. R.; YUAN, Z.; QIN, W.; GHAZIASKAR, H. S.; POIRIER, M.; XU, C. C. **Thermodynamic and kinetic studies of a catalytic process to convert glycerol into solketal as an oxygenated fuel additive**, *Fuel*, v. 117, p. 470–477, 2014.

NANDA, M. R.; ZHANG, Y.; YUAN, Z.; QIN, W.; GHAZIASKAR, H. S.; XU, C. C., **Catalytic conversion of glycerol for sustainable production of solketal as a fuel additive: A review**, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 56, p. 1022–1031, 2016.

REDDY, P. S.; SUDARSANAM, P.; MALLESHAM, B.; RAJU, G.; REDDY, B. M., **Acetalisation of glycerol with acetone over zirconia and promoted zirconia catalysts under mild reaction conditions**, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 17, p. 377-381, 2011.

ROSSA, V.; PESSANHA, Y. da S. P.; DÍAZ, G. Ch.; CÂMARA, L. D. T.; PERGHER, S. B. C.; ARANDA, D. A. G., **Reaction Kinetic Study of Solketal Production from Glycerol Ketalization with Acetone**, *Ind. Eng. Chem. Res.*, v. 56(2), p. 479–488, 2017.

ROYON, D.; LOCATELLI, S.; GONZO, E.E., **Ketalization of glycerol to solketal in supercritical acetone**, *J. of Supercritical Fluids*, v. 58, p. 88-92, 2011.

SÁNCHEZ, E.A., D'ANGELO, M.A., COMELLI, R.A., **Hydrogen production from glycerol on Ni/Al<sub>2</sub>O<sub>4</sub> catalyst**, *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 5902-5907, 2010.

SANDESH, S.; HALGERI, A.B.; SHANBHAG, G. V., **Utilization of renewable resources: Condensation of glycerol with acetone at room temperature catalyzed by organic–inorganic hybridcatalyst**, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 401, p. 73–80, 2015.

STAWICKA, K.; DÍAZ-ÁLVAREZ, A. E.; CALVINO-CASILDA, V.; TREJDA, M.; BAÑARES, M. A.; ZIOLEK, M., **The Role of Brønsted and Lewis Acid Sites in Acetalization of Glycerol over Modified Mesoporous Cellular Foams**, *J. Phys. Chem. C*, 120, 16699–16711, 2016.

SHEKARA, B. M.; REDDY, C. R.; MADHURANTHAKAM, C. R.; JAI PRAKASH, B. S.; BHAT, Y. S., **Kinetics of Esterification of Phenylacetic Acid with p-Cresol over H-β-Zeolite Catalyst under Microwave Irradiation**, *Ind. Eng. Chem. Res.*, v. 50, p. 3829-3835, 2011.

SILVA, C. X. A. D.; MOTA, C. J. A., **The influence of impurities on the acid-catalyzed reaction of glycerol with acetone**, *Biomassa and Bioenergy*, v. 35, p. 3547-3551, 2011.

## ESTUDOS MICROBIOLÓGICOS DAS FOLHAS DA *Eugenia uniflora* Linn. (PITANGA)

### **Giovanna Gabrielly Alves da Silva Fraga**

Discentes Do Centro Universitário Tabosa De  
Almeida – ASCES/UNITA

### **Maria Gabrielle de Oliveira Tabosa**

Discentes Do Centro Universitário Tabosa De  
Almeida – ASCES/UNITA

### **Emilay Lira de Freitas**

Discentes Do Centro Universitário Tabosa De  
Almeida – ASCES/UNITA

### **Leticia Vieira dos Santos Beserra**

Discentes Do Centro Universitário Tabosa De  
Almeida – ASCES/UNITA

### **Arquimedes Fernandes Monteiro de Melo**

Doscentes Do Centro Universitário Tabosa De  
Almeida – ASCES/UNITA

### **Risonildo Pereira Cordeiro**

Doscentes Do Centro Universitário Tabosa De  
Almeida – ASCES/UNITA

**RESUMO:** O presente trabalho aplicou uma metodologia para a análise microbiológica das folhas da *Eugenia uniflora* (pitanga). A partir dos resultados obtidos será possível analisar se a planta possui ação inibitória frente aos microrganismos testados.

**PALAVRAS-CHAVES:** *Eugenia uniflora*, microrganismos, atividade antimicrobiana

## INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais é considerado uma alternativa muito útil em programas de atenção primária de saúde, já que há justificativa científica das propriedades terapêuticas, sendo assim recomendável especialmente no atendimento de comunidades carentes (MATOS, 1997). Nesse contexto, surge a *Eugenia uniflora* L. (pitanga), um vegetal originário do Brasil. A *Eugenia uniflora* L. pertencente à família Myrtaceae apresenta um grande número de constituintes potencialmente terapêuticos, além de ser uma planta de fruto comestível muito conceituada em todos os lugares do Brasil. Esta espécie demonstra distintos efeitos terapêuticos sendo um deles, um alto potencial antimicrobiano e alta atividade antifúngica por meio de suas folhas.

As informações sobre a atividade antimicrobiana da *E. uniflora* variam de acordo com a colheita, estação do ano e estágio de maturidade (AURICCHIO et al., 2003). Segundo uma pesquisa levantada por Auricchio (2007) a atividade antimicrobiana das folhas da *E. uniflora* sobre o extrato hidroalcoólico a 70% mostrou ter concentração inibitória mínima (CIM) de 100 g/mL sobre *Staphylococcus aureus*. O óleo essencial da pitanga apresenta ação antibactericida sobre as bactérias Gram-

positivas e Gram-negativas demonstrando uma reação variada com maior atividade de inibição igual ou inferior a 10 mm de diâmetro.

Conforme a pesquisa de Ogunwande et al. (2005) a atividade antibacteriana da folha e fruto da *E. uniflora* sobre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas apresentou grande ação contra *Staphylococcus aureus* com CIM de 39 µg/ml, na mesma proporção houve resultados de inibição sobre *Bacillus cereus*, provocado pelo óleo das folhas. A avaliação dos óleos essenciais das folhas frescas de algumas espécies da família Myrtaceae, incluindo a *E. uniflora* demonstrou que os diferentes óleos essenciais tinham diferentes ações antimicrobianas (LIMBERGER et al. 1998 apud AURICCHIO, 2003).

## OBJETIVOS

Analisar o Potencial Inibitório (PI), Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) das folhas da *Eugenia uniflora* (pitanga).

## METODOLOGIA

Primordialmente foi realizado o extrato das folhas da pitanga onde as mesmas foram colocadas por um período de 24h a sombra e em seguida depositadas na estufa botânica à 40°C para secagem. Posteriormente, as folhas secas foram reduzidas a pó no moinho industrial e encaminhadas à maceração com solução hidroalcoólica a 95% v/v durante 7 dias. As folhas foram filtradas e evaporadas, obtendo assim os extratos brutos fluidos. Após a evaporação de 95% da solução, os extratos foram colocados em uma estufa de ar circulante (B.O.D), até a secura total.

Para a realização da análise do potencial inibitório replicou-se a bactéria suspensas em 5mL de soro fisiológico dentro de tubos de ensaio e em seguida embebedou o swab com essa solução. A bactéria foi repicada para a placa de Petri que já estava com o meio Agar Mueller-Hinton, previamente esterilizado e realizou-se o semeio em forma de tapete. Dando seguimento ao teste, foram feitos os poços na placa, os quais foram preenchidos com 50µL da diluição do extrato representando as concentrações de 50%, 25%, 12,5% e 6,25% em relação à amostra inicial (1g de extrato bruto seco). Para controle foi utilizado o antibiótico Amoxicilina. Posteriormente, foram colocados na estufa a 37°C por no mínimo 18 horas. A avaliação foi feita verificando-se, com o auxílio de uma régua, o diâmetro do halo formado ao redor do disco contendo o extrato.

Logo após foi realizado o teste da Concentração inibitória mínima, onde um semeio de bactéria foi realizado, utilizando-se o swab, na placa de Petri contendo Ágar Mueller-Hinton. As placas foram semeadas tipo tapete e feito nelas quatro poços de 6mm de diâmetro, pipetando 50µL de extrato bruto seco em diferentes concentrações,

a partir de diluições em 50%, 25%, 12,50% e 6,25% com relação à amostra inicial do extrato bruto seco obtido (1g), realizou-se o procedimento em duplicata. As placas foram incubadas a 37°C por no mínimo 18 horas para análise de resultados, que constará da mínima concentração a formar halo.

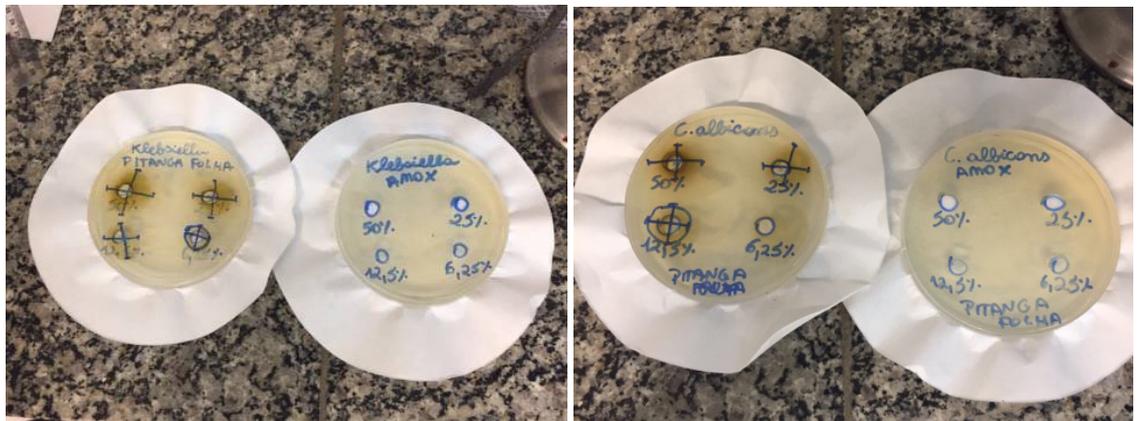
Já na análise da Concentração inibitória mínima de aderência (CIMA) colocou-se a bactéria em suspensão em soro fisiológico e em seguida transferiu 1  $\mu$ L dessa solução com bactéria para o tubo estéril com 4,5 mL de meio Mueller-Hinton em caldo e 0,5 mL da solução extrato em cada diluição identificando os tubos com seus respectivos valores: 50%, 25%, 12,5% e 6,25%. Por fim os tubos foram colocados inclinados em 30° na estufa a 37°C por 18 a 24 horas para serem analisados os resultados com a adição da fucsina ou azul metileno.

## RESULTADOS

### Potencial inibitório

O PI tem como função analisar se o extrato utilizado apresenta ou não ação antibiótica frente às bactérias testadas. O extrato da Pitanga apresentou ação inibitória nas concentrações testadas de 50%, 25% e 12,5% frente a cepas de *S. aureus* e *C. albicans*, e nas concentrações de 50%, 25%, 12,5% e 6,25% na cepa de *Klebsiella*, conforme tabela abaixo:

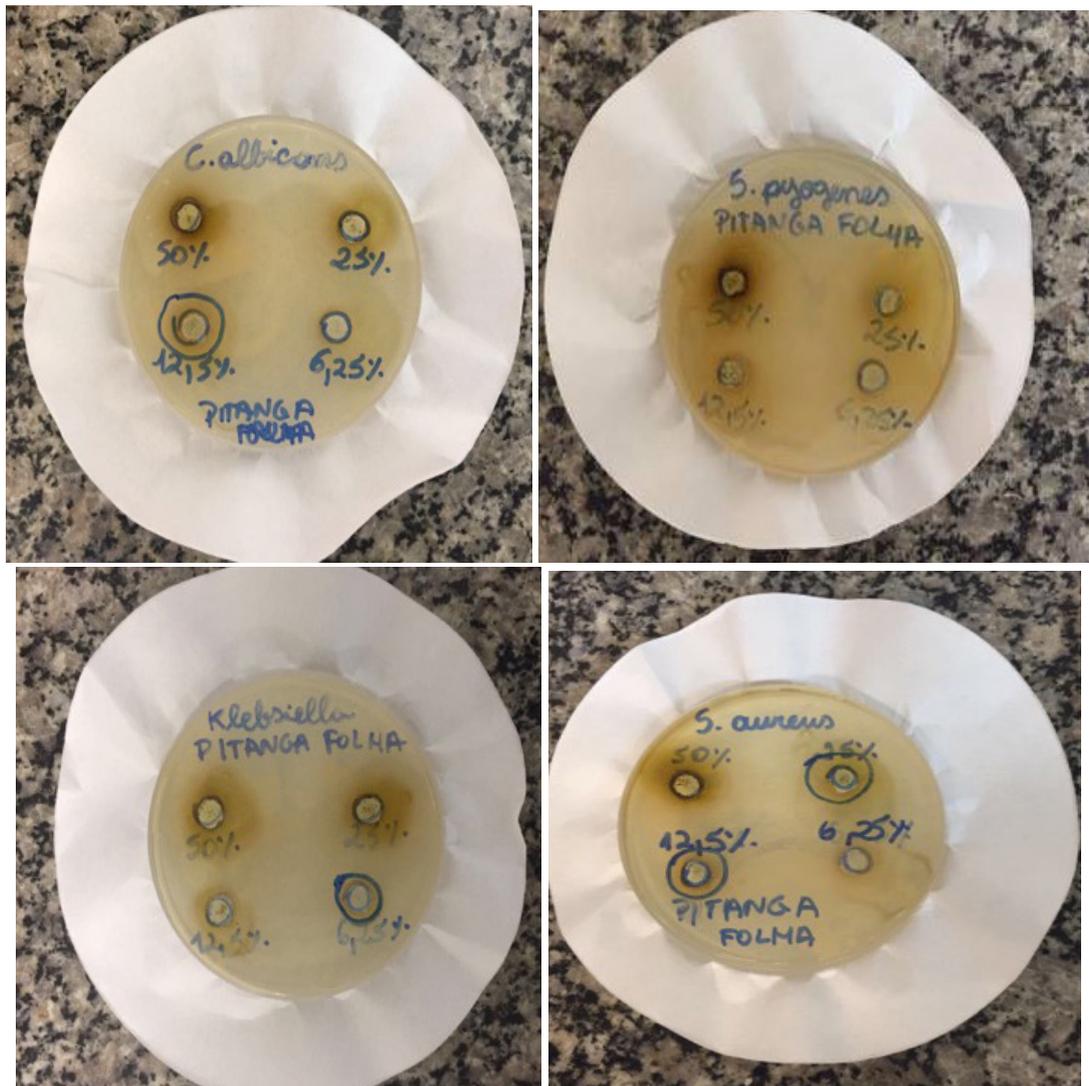
POTENCIAL INIBITÓRIO				
Cepa	50%	25%	12,5%	6,25%
<i>S. pyogenes</i>	--	--	---	---
<i>Klebsiella</i>	25 mm	20 mm	19 mm	12 mm
<i>S. aureus</i>	24 mm	16 mm	13 mm	---
<i>C. albicans</i>	25 mm	20 mm	18 mm	---



As imagens representam os microrganismos *Klebsiella* e *C. albicans*

## CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

O CIM possui um papel de determinar a menor concentração de extrato necessária para inibir o crescimento do microrganismo inoculado. O resultado apontou que o extrato utilizado apresentou formação de halo foi de 6,25%, na cepa de *Klebsiella* como revela as imagens abaixo:



## CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE ADERÊNCIA

Os resultados do CIMA avaliaram a menor concentração necessária para inibir a aderência dos micro-organismos, nos tubos de vidro, obtendo os seguintes resultados:

CIMA				
Cepa	50%	25%	12,5%	6,25%
<i>S. pyogenes</i>	-	+	+	+
<i>Klebsiella</i>	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-
<b>+ formou biofilme</b> <b>- não formou biofilme</b>				



Teste realizado com os seguintes microrganismos: *S. pyogenes*, *Klebsiella*, *S. aureus* e *C. albicans* demonstrando a formação e não formação de biofilmes.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A amostra apresentou ação para a determinação da Concentração Inibitória Mínima de Aderência nas concentrações e condições testadas porém não pode apresentar formação de biofilme na parede do tubo. Além de apresentar formação de halo que representa que o extrato analisado demonstra ação antibiótica nas concentrações e condições testadas.

## REFERÊNCIAS

AURICCHIO, M. T. Estudo Farmacognóstico de folhas de *Eugenia uniflora* L. São Paulo, 2001. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo].

AURICCHIO, M. T., e Bacchi, E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Rev.Inst. Adolfo Lutz**, n. 62, p. 55 - 61. 2003.

AURICCHIO, M. T.; Bugno, A., Barros, C. B. M., Bacchi, E. M. Atividades Antimicrobiana e Antioxidante e Toxicidade de *Eugenia uniflora*. **Latin American Journal of Pharmacy**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2007.

MATOS, F. J. A. Introdução à fitoquímica experimental, Fortaleza, UFC Edições, 1997, pp. 141.

OGUNWANDE, I. A. et al. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **The International Journal of Aromatherapy**, n. 15, p. 147– 152, 2005.

## NEW PROCESS FOR OBTAINING NANOCHITOSAN / BURITI OIL (*Mauritia flexuosa*) BIOCOMPOSITE: A BIOMATERIAL FOR REGENERATIVE MEDICINE AND TISSUE ENGINEERING

**Júlia Silveira Broquá**

**Luciano Pighinelli**

**Magda Comoretto Gall**

**Jader Figueiredo**

**Giovani André Piva**

**Lucas Eduardo Lopes Machado**

**Pamela Persson**

**Anderson Rockenbach**

**Renata Pospichil**

**Luan Rios Paz**

**Fernando Guimarães**

**Gabrielle Zanin**

**Marzena Kmiec Pighinelli**

**ABSTRACT:** For ages, wound healing is a big challenge for health area and scientific community and the major goal is to develop the most effective wound dressing to cover and protect the injuries from external infections and to accelerate healing process. Chitosan is the only biopolymer positively charged in nature, with antioxidant, antimicrobial and antifungal properties. In nanocrystalline chitosan, the crystallinity is reduced resulting in a nanomaterial with reactivity and adhesiveness. The complexation of nanochitosan with essential oils, such as *Mauritia flexuosa* (Buriti), provides a unique biomaterial with great potential for regenerative medicine. The objective of this work was to obtain a

biocomposite with nanochitosan and Buriti oil through a new process, with great properties for the health area. The process is divided into two steps, starting with the dissolution of chitosan. The second step comprises in the coagulation of glucosamine molecules in a nanoparticulate matrix, performed in aqueous medium. In the Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR-ATR) analysis, the characteristic groups of nanochitosan and Buriti oil were identified. The Scanning Electron Microscopy (SEM) analysis showed nanopolymer agglomerates, suggesting the encapsulation of the oil by nanochitosan. Particle Size analysis showed a slight increase in the biocomposite compared to nanochitosan, corroborating with the encapsulation, also a decrease in polydispersity that promotes a stable compound. Microbiological tests showed greater inhibition in the biocomposite compared to oil and polymer individually. The final biomaterial did not show phase separation, and intensified the expected characteristics, confirming the potential of the biomaterial.

**KEYWORDS:** *Regenerative Medicine, Chitosan, Essential Oil, Nanotechnology*

### 1 | INTRODUCTION

The skin is the largest and most exposed organ in our bodies, thus it is the most susceptible

to injuries (MERCURIO, 2015). The term wound refers to the damage and/or rupture (interruption of continuity) of the skin (FRANCO, 2014). The human body has the capacity of healing some injuries, being the wound healing one of the most commons.

### 1.1 Skin Wound: Development and Mechanisms

This process consists of 3 overlapping phases: inflammatory, proliferation, and remodeling (OLIVEIRA GONZALEZ, 2016).

- Inflammatory phase is described as the migration of leukocytes to the damaged area, aiming the destruction of microorganisms and dead cells. This phase is recognized by the erythema (redness of the surrounding tissue), occurring in the first 24 hours and lasting up to two days.
- Proliferation phase is the phase responsible for the closing of the wound, causing contraction, the formation of fibrous tissue, cell production for extracellular matrix creation, followed by reepithelization of the skin. This process begins in the first two days and can endure for about two weeks.
- Remodeling phase is the longest step in the whole process, taking from 2 or 3 weeks to over 1 year. Consists of the rearrangement of the extracellular matrix, with the purpose of achieving the maximum tensile strength. The rearrangement of the matrix is made by reorganization, degradation, and resynthesizes of it. The failed subsequent attempts of reobtaining previous tissue structure create the scar tissue.

Being a recurrent issue that all the world population is susceptible to has caused the WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017) to recognize the skin wound as a hidden epidemy. There is a huge concern about the efficiency and price of existing treatments, causing the necessity of research on new materials and methods.

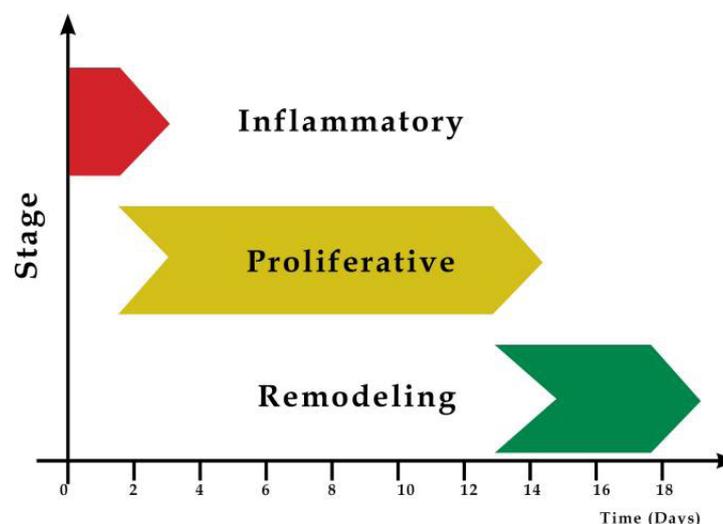


Figure 1: Stages of wound healing. Source: OLIVEIRA GONZALEZ, 2016.

### 1.2 Existing Treatments

The mainly employed treatment consists in the seaming (if needed) and appliance of dressings such as cotton gauze, preferentially with a nonadherent and antimicrobial

material applied, to prevent the removal of newly formed epithelial tissue and infections by external agents (ARAMWIT, 2016). It is common for it has low cost, although it's not the most efficient.

Another used method is the autografting, which consists of grafting skin tissue removed from another area of the same individual. This method has high efficiency but has a limit on how much skin can be grafted, plus the shortness on skin donations. This issue contributes the research and development of artificial tissue for grafting, although these researches face many obstacles, such as instability and risk of infection. The focus on material development is now in the biomaterials since they possess many properties that make them eligible in the health area. There are various biomaterials already present in research and healthcare market, from both synthetical or natural sources.

As representatives of the synthetical biopolymers in wound healing, we can find in literature: Polyurethanes (and derivatives), polytetrafluoroethylene (Teflon®), silicone, among others.

The natural biopolymers have furtherly more desirable properties, making them suitable for potential substitution of ECM (extracellular matrix). The shared properties they carry are: relieving effect, astringent, antimicrobial, anti-inflammatory, etc. These polymers are used as a coating, serving as protection from external agents, as well as stimulating the angiogenesis (cell proliferation). Another characteristic most biopolymers share is that they are negatively charged ions, except for one: chitosan. Chitosan is the deacetylated version of chitin, a biopolymer obtained throughout demineralization and deproteination of fishing industries waste such as shrimp and crab shells.

### 1.3 Chitin and Chitosan

Chitin (N-Acetyl  $\beta$ -D-Glucosamine) is the second most abundant structural biopolymer on Earth. In nature, it possesses two types of structural configuration: alpha and beta, being the first the one with higher mechanical resistance and the second the one with higher elasticity. A third allomorph can be created in a laboratory, mixing the previous configurations: gamma.

The worldwide fishing industries can sum about  $10^{11}$  tons of waste and from that paradigm grew the interest of scientists to study and apply the biopolymer obtained from it in other sectors of interest, such as healthcare and cosmetics. Chitin is obtained from that waste, then suffers a process of deacetylation, which consists in a strong attack on acetyl groups, giving way to the amino groups to remain on the molecule surface, improving the biopolymer reactiveness. It is precisely that amino group the one responsible for the positive ionic charge of chitosan. This trait brings us an enormous amount of materials that can be complexed with chitosan, furtherly enhancing its properties and even giving it new ones (BROQUÁ, 2018).

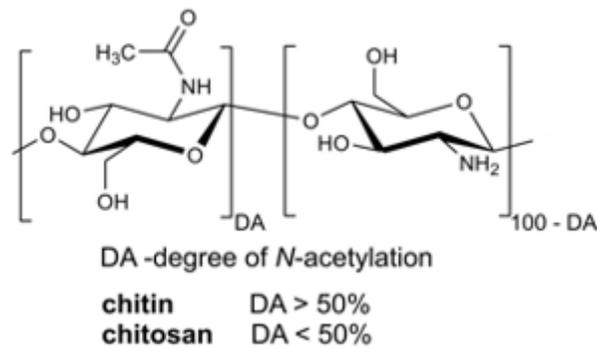


Figure 2: Representation of chitin and chitosan molecules. Source: KUMIRSKA et al, 2010.

As shown in this previous figure, chitosan is nothing more than the version of chitin with less than 50% of Degree of Acetylation (DA). The reduction of acetyl groups reduces the biopolymer's strength, but on the other hand, provides some more properties, which we can compare below.

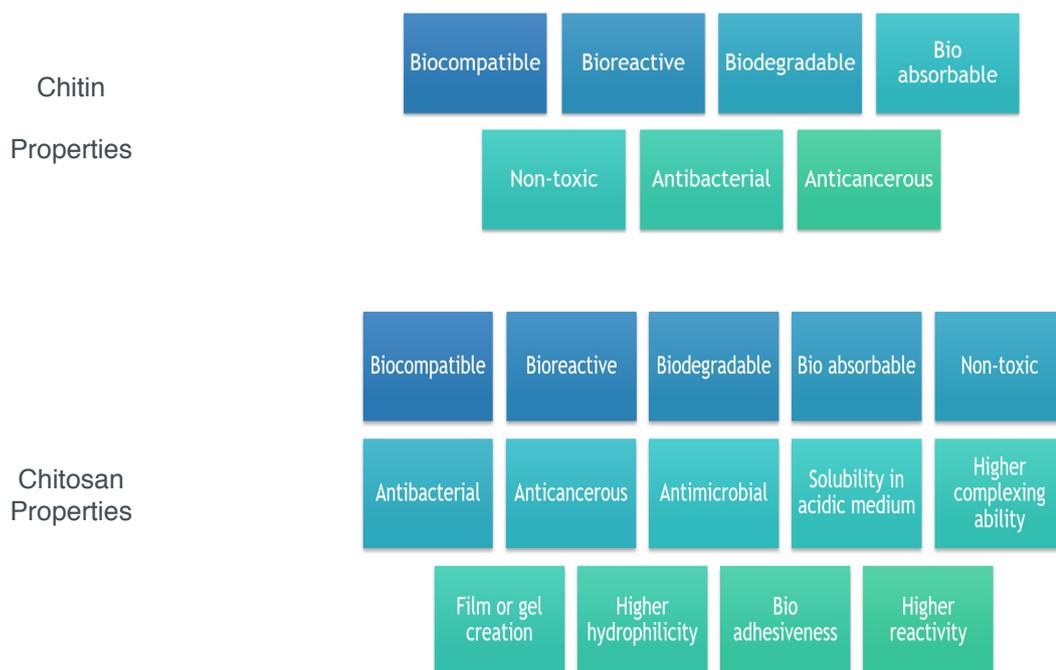


Figure 3: Board presenting chitin and chitosan properties. Source: FIGUEIREDO et al, 2018

These properties have been studied along many decades, yet the optimum chitosan is still to be developed since there are various conditions of extraction and production that affect the properties, thus being advised to assemble a process for each different necessity, using a different production method. The industrial production employs chemical agents in demineralization, deproteination, and deacetylation, which is a cheap and practical method but results in the production of effluents that will require treatment. There are studies regarding biotechnological means of production, that are not yet usable in mass production for they require higher control and time. The optimum

response could be the combination of both methods, using practicality and less aggressive materials to obtain the best both processes have to offer.

## Methods comparison

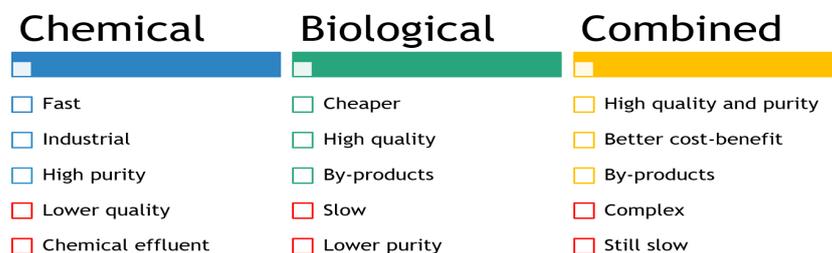
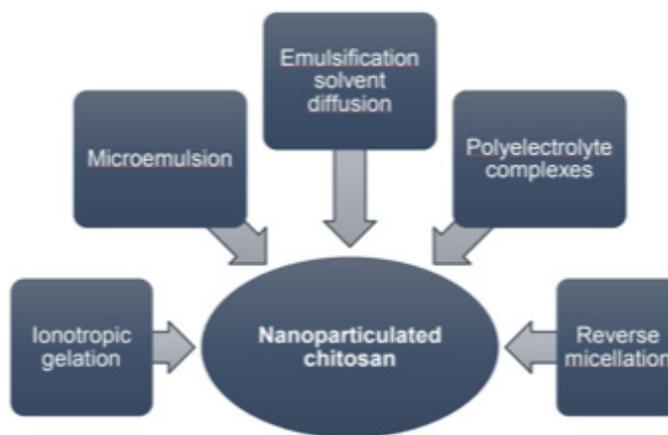


Figure 4: Board with a comparison between chitin production methods. Source: FIGUEIREDO et al, 2018.

Another tendency in researches regards the use of nanoparticulated materials. In the case of chitosan, there are some methods of nanoparticulated chitosan obtention. These methods work by amplifying the biopolymer's reactivity, enhancing previous properties even further and allowing new possibilities such as encapsulating other materials, which improves its capacity of complexation. Some of the methods found in the literature (DIVYA, 2018) are:



Nanomaterials are usually hard to obtain, the methods above do not run from that statement. One of the most accessible and operative methods in literature is the coagulation method (PIGHINELLI, 2016), the one we chose to apply in our studies of skin wound healing.

### 1.3.1 Chitosan Complexed Biomaterials

As a multi-property biopolymer that has the ability to link with other materials, chitosan is widely studied around the world, hence being the protagonist of various

projects involving complexed materials.

From literature, we can resume some of its applications regarding biotechnology, especially in the medical and pharmaceutical areas, in the following figure:

Biocatalysts	Scaffolds as a support for metals in order to produce catalysts.
Biomedical	Enzyme immobilization and purification chelator; an emulsifier; flocculent; blood cholesterol control; Lectin affinity chromatography; biosensor; immobilization of antibody in the presence of alginate; hemostatic agents.
Medical	Fibers; membranes; artificial organs and skin; surgical sutures; bone and cartilage regeneration; wound healing and dressings; cancer diagnosis; aid in cataract surgery; periodontal disease treatment; collagen synthesis; contact lenses; tumor therapy; stem cell technology.
Pharmaceutical	Manganese supplement complex; drug release; gene delivery.

Figure 6: a board with main chitosan applications in healthcare. Source: BROQUÁ et al, 2018.

According to Dhandayuthapani et al (2011), chitosan is mainly used as a scaffold, a 3D structure that serves as support to the complexed materials. There are many types of scaffold: Nano/microsphere encapsulation (bone and tissue regeneration), injectable gel scaffolds (cartilage and bone regeneration, drug delivery), hydrogel scaffolds (biosensors, matrix components and cell-cell interactions), fibrous scaffolds (vascular grafts, tissue scaffolds, etc.) and a group named functional scaffolds (includes membranes, foams, hydrogels, microspheres, and particles; used for angiogenesis stimuli, bone regeneration and wound healing).

The applications, as seen before, are nearly unlimited. Having such biopolymer with such vast applications, the next step in the development of a new biocomposite is to choose another material with the properties that are desirable for the product to be developed that is compatible with the positive electrochemical charge of the chitosan, thus being required a negative charge from the added component.

The Brazilian biodiversity is an example of a natural biopolymer source, especially in the Amazonian area (ROMERO, 2017). Among the supplies available due to the climate conditions of that area, the ones with high applicability in the healthcare area are the essential oils. These oils have been used by society for a long while, based on some sort of popular belief of it's healing properties.

The Buriti (*Mauritia Flexuosa*) essential oil has been used for wound healing in Brazil by its Amazonian population, and those healing properties have been confirmed in studies (SARAIVA, 2009). According to Freitas (2018), the Buriti essential oil can be encapsulated by isolated soy protein positively charged, under the PH of 4.6, corroborating the fact that the essential oil in question has a negative electrical charge due to its fatty acids.

## 2 | EXPERIMENTAL METHOD

The research and method were developed in Biomatter P&D and Innovation on Biomaterials Lab, Lutheran University of Brazil. The SENAI Institute of Innovation in Polymer Engineering and Advanced Microscopy Multiuser Laboratory (LMMA) in PiauÍ Federal University realized the analyses. The method of obtaining the Nanocrystalline Chitosan / Buriti Oil biocomposite (NCCH/B) occurred according to the patents: INBI BR 102017022292-6 and INBI BR 102017022720-0. The process can be divided into two steps, starting with the dissolution into a chitosan salt and then coagulation with Buriti oil.

### 2.1 Chitosan Dissolution

The commercial chitosan was purchased from Polymar (Fortaleza, CE) with a 95% degree of deacetylation, 12,4% moisture content, 0,31 g/mL density with a yellowish color. Firstly, 1% of the polymer powder was mixed with 500mL of deionized water. Acetic acid solution 0,4% (w/v) was prepared in half of the quantity of water and then added to the chitosan solution (2h, 600-800 RPM). The dissolution ends with 1L of a transparent solution. Afterward, the chitosan acetate (CA) was filtered to removing insoluble particles. The CA was stored at 5°C for 24h.

### 2.2 Nanocrystalline Chitosan / Buriti Oil Process of Obtaining

A new methodology was developed based on the agglutination method to synthesize the nanoparticulate chitosan (INBI BR 102017022292-6). A solution of NaOH was prepared according to the same ratio of the acetic acid solution. Using the CA solution obtained, as previously described, the NaOH solution was gradually added with constant stirring (1000 RPM) and pH control. This is the crucial step of the process because both complexation and the nanostructured chitosan are obtained; therefore, all the parameters are extremally controlled for the correct formation of nanocrystals. In the pH 5, started the slow addition of Buriti oil in the same ratio of polymer content. This ratio was chosen to preserve the integrity of the oil, which has pH 4,5. After all the oil was added, at the same polymer content, the acidic solution was neutralized to pH 7,4 (3h, 700 RPM). The final solution (NCCH/B) was stored at 5°C for 24h. The sodium hydroxide has the function of agglomerating the glucosamine monomers in the chitosan acetate in a nanostructured matrix, neutralizing the solution at the same time. The free oil in the solution is encapsulated while the coagulation occurs. The NCCH/B solution was filtered and washed until the discarded water becomes neutral, in order to eliminate the residual sodium acetate salt that was formed in the neutralization phase. It was no observed residual oil in the washing process. Thereafter, 10 samples with 25mL of NCCH/B biocomposite was added in Petri plates to dry for the posterior analyses and a high concentration solution was stored at 5°C.

## 3 | RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Nanocrystalline Chitosan / Buriti Oil Biocomposite

This methodology was performed using three different concentrations of oil to obtain the biocomposite: 0,5%, 1%, and 2%. The 1% solution was chosen to continue the studies because it was homogeneous, with no phase segregation or migration of the oil to the film surface and with the complete encapsulation of the oil by the nanochitosan. The NCCH/B films had a yellowish and orange color, according to the Buriti oil ratio, and the solution with a gel texture (Figure 7).



Figure 7: NCCH/B films with 1:0,5, 1:1 and 1:2 of Buriti oil and polymer content, and NCCH/B gel-like solution, respectively. Source: FIGUEIREDO et al, 2018. The synthesis of NCCH/B biocomposite is not characterized as an ordinary mixture of biopolymer and oil, but a new method of obtaining the material studied. Since this composite has been obtained in an aqueous medium and the difference of polarity, composition of the substances, different densities and structures support the idea of complexation. Buriti oil presents in its composition many fatty acids containing ions compatible with the amine group from chitosan, which justifies the complexation with one or more of these fatty acids, still not identified.

### 3.2 Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR-ATR)

Figure 9 represents the spectra of nanocrystalline chitosan (NCCH). The presence of the functional groups  $\text{NH}_2$  ( $1590 \text{ cm}^{-1}$ ), amide I ( $1746 \text{ cm}^{-1}$ ), amide II ( $1419 \text{ cm}^{-1}$ ) from the NCCH is observed. The most intense energy peaks ( $1026$  and  $938 \text{ cm}^{-1}$ ) identified the COC (glucose- $\beta$ -1-4) stretch, corresponding to the vibrations of the skeletal stretch of the polysaccharide structure. N-H and O-H energy peaks are also observed at  $3357 \text{ cm}^{-1}$  and  $3287 \text{ cm}^{-1}$ .

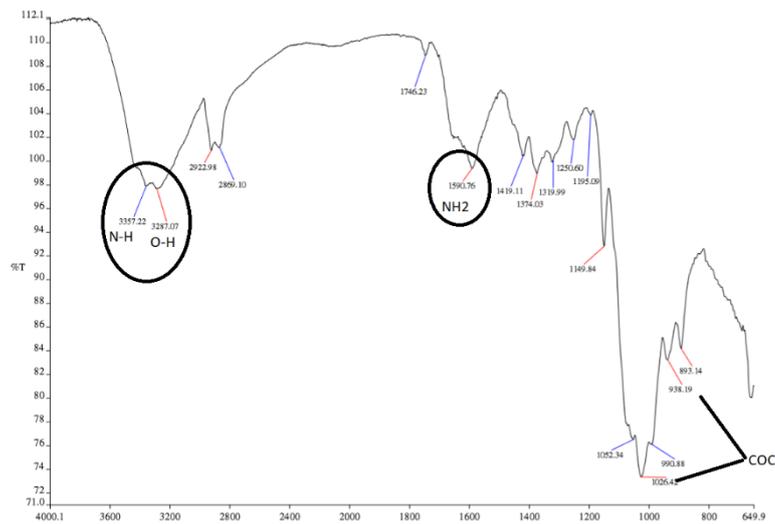


Figure 9: FTIR spectra of NCCH. Source: PIGHINELLI, 2016.

Figure 10 represents the spectra of Buriti oil, with a band formed in the region near  $1750\text{ cm}^{-1}$ , where the  $\text{C}=\text{O}$  bond is observed. This band is a hallmark of the oils spectra. Figure 11 represents the spectra of NCCH/B biocomposite, where it is observed that the band near  $1750\text{ cm}^{-1}$ , characteristic of the bond  $\text{C}=\text{O}$  of Buriti oil, remained with some important peaks of nano-chitosan, as the functional group  $\text{NH}_2$  (near  $1600\text{ cm}^{-1}$ ). Other important peaks of NCCH were observed with small displacements such as ( $1100\text{ cm}^{-1}$  and  $1050\text{ cm}^{-1}$ ) that identified COC (glucose- $\beta$ -1-4) stretch corresponding to the stretching vibrations of the polysaccharide backbone structure. N-H and O-H near  $3500\text{ cm}^{-1}$  are also observed.

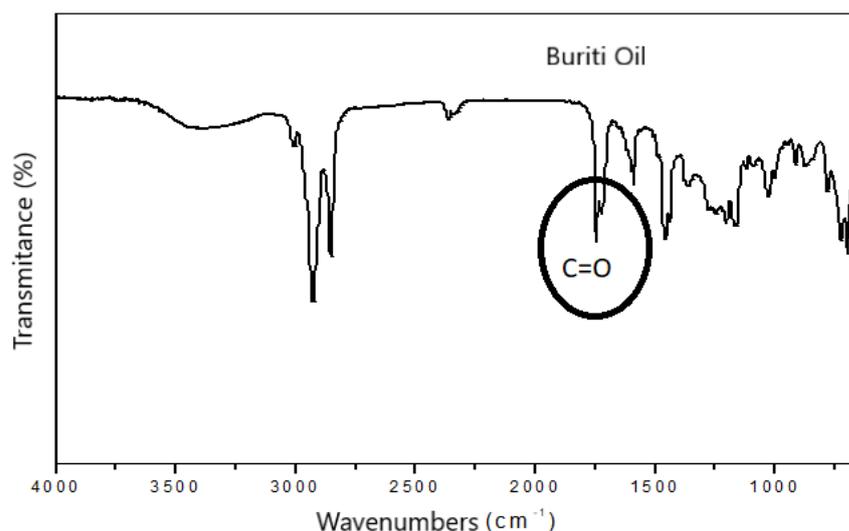


Figure 10: FTIR spectra of Buriti oil. Source: FIGUEIREDO et al, 2018.

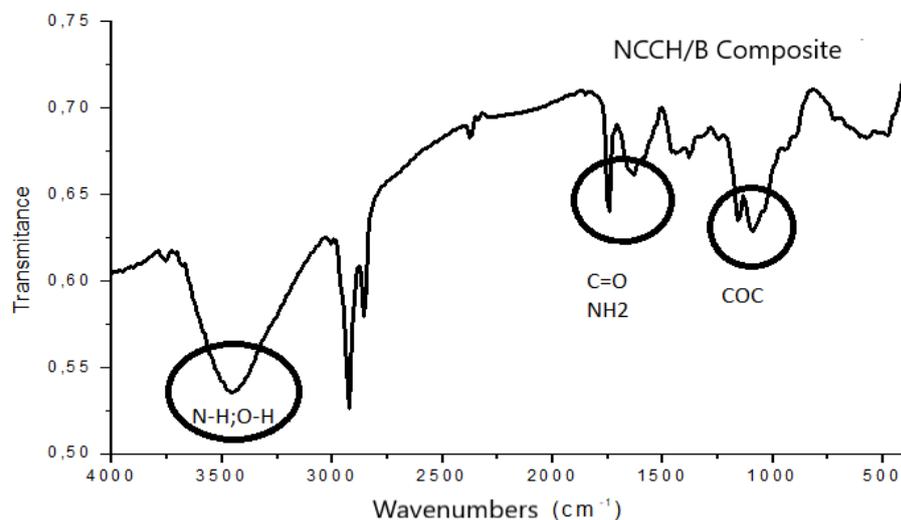


Figure 11: FTIR spectra of NCCH/B biocomposite. Source: FIGUEIREDO et al, 2018.

### 3.3 Scanning Electron Spectroscopy (SEM) Analysis

The SEM analysis of nanoparticulate chitosan (Figure 12-a) are homogeneous, with roughness and formation of agglomerates due to their amorphous nature, whereas the SEM analysis of NCCH/B biocomposite shows a velvety area related to the oil (Figure 12-b), with many agglomerates of NCCH due to high polydispersity (Figure 12-c).

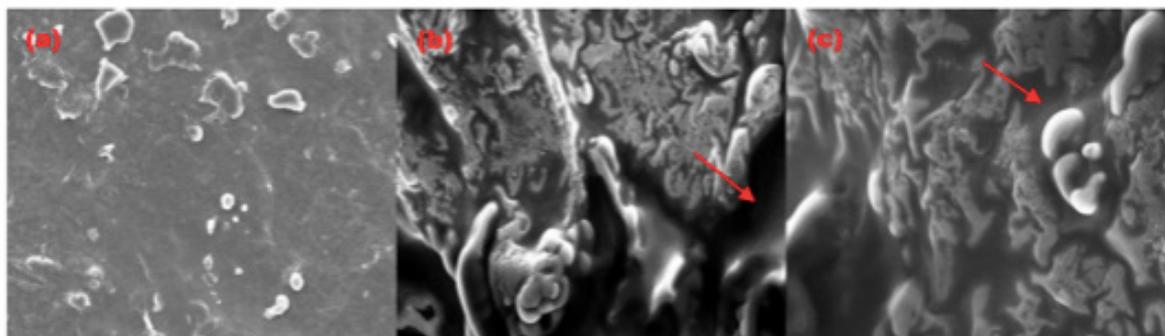


Figure 12: (a) The SEM analysis of NCCH in x500 magnitude, while (b) and (c) are the SEM analysis of NCCH / B biocomposite in x500 and x1000, respectively. Source: FIGUEIREDO et al, 2018.

The nanostructured chitosan is more reactive, with high absorption potential up to 600% (PIGHINELLI, 2017) proliferation (fibroblast phase. Due to the process, the glucosamine macromolecule breakage occurs in dissolution, and then reconstructed in the coagulation process, with a high reduction of the crystalline area and improvement of the amorphous area. This crystalline modification allows the improvement of some characteristics, such as reactivity and adhesion potential.

In NCCH/B biocomposite images, it can be noticed that the chitosan nanoparticles remain intact, wrapped by Buriti oil outside the capsules. It is also observed a swelling effect in the nanoparticles, suggesting the encapsulation of the oil by the polymer,

based on literature review.

### 3.4 Particle Size

Particle Size analyses were performed in NCCH 1% and NCCH/B 1:1 for comparison. A Mesh 0,450 filter was used in order to reduce the high polydispersity of the nanoparticles and standardize the particle size. Furthermore, were performed six measures for each, and calculated the average value of the results. The particle size of nanoparticulate chitosan originated from agglomeration process ranges from 20 nm for 120 nm, with an average of 55,4 nm (PIGHINELLI, 2017) proliferation (fibroblast phase. The results are illustrated in Table x. The NCCH has an average of 85 nm, while the NCCH/B biocomposite has an average of 134 nm.

SAMPLES	MEASURES	PARTICLE SIZE (nm)	POLYDISPERSITY
NCCH	1	80,93	0,370
NCCH	2	96,06	0,766
NCCH	3	57,91	0,923
NCCH	4	123,91	0,338
NCCH	5	65,63	0,353
NCCH	6	85,56	0,550
<b>NCCH</b>	<b>AVERAGE</b>	<b>85,00</b>	<b>0,550</b>
NCCH/B	1	171,57	0,312
NCCH/B	2	197,56	0,278
NCCH/B	3	95,43	0,215
NCCH/B	4	112,65	0,271
NCCH/B	5	98,71	0,284
NCCH/B	6	126,51	0,248
<b>NCCH/B</b>	<b>AVERAGE</b>	<b>134,00</b>	<b>0,268</b>

Table 1: Particle Size results of NCCH and NCCH/B biocomposite. Source: FIGUEIREDO et al, 2018.

It is noted an increase in particle sizes of NCCH/B biocomposite (134 nm) when compared to NCCH (85 nm). This phenomenon suggests the encapsulation of the oil, already studied and performed in literature, with Souza *et al.* (2014) and Hosseini *et al.* (2013) works. Freitas (2016) had a similar average of particle size using Zein, chitosan, and essential oils particles, with the same increase phenomenon, compared to the single chitosan. It's still possible to observe a reduction of polydispersity in NCCH/B, from 0,550 to 0,268, suggesting more stability in NCCH/B biocomposite solution.

### 3.5 Microbiological Test

The microbiological tests were carried out in the ULBRA Canoas, Microbiology Lab, using the macrodilution technique. Increasing amounts of each of the samples

analyzed were used to determine the Minimum Bactericidal Concentration (MBC). The macrodilution method was applied by the Microbiology Laboratory in a way it could be applied to the biopolymers potential properties appointed by the literature. The selected bacteria were: *Escherichia coli* (as a Gram-negative) and *Staphylococcus aureus* (as a Gram-positive). For this test, three different analyses were performed: nanocrystalline chitosan and Buriti oil alone, and NCCH/B biocomposite. All these samples for the assays were pre-sterilized in an autoclave at 121° C for 15 minutes, as well as all materials used and culture media, to avoid interference of other bacteria from the environment. The technical procedures were performed according to the Quality Criteria for Microbiological Analysis (OPLUSTIL, 2010).

### 3.5.1 Inoculum preparation

The bacterial strains references used were *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922) and *Escherichia coli* (ATCC 25923). Lyophilized bacteria were prepared according to the manufacturer's recommendation. Afterward, they were sown in a petri dish containing TSA Agar and incubated at 35°C for 24h (OPLUSTIL, 2010).

### 3.5.2 Macrodilution method

The dilution method used two series of 10 Erlenmeyer flasks with BHI (Brain and heart Infusion) culture medium for each of the 3 samples (Buriti, NCCH, and NCCH/B) containing 1.0; 2.0; 3.0; 4.0; 5.0 ... to 10 ml of samples in each of the bottles of the respective sequence. In the first Erlenmeyer, 1 ml of sample and 18 ml of BHI broth was pipetted. In the second Erlenmeyer, 2 ml of sample and 17 ml of BHI were pipetted, successively, always increasing 1 ml of sample to each new flask and reducing 1 ml in the broth. Afterward, 1ml of the bacterial suspension was added to the first flask. The flask n°1 was thoroughly homogenized and 1 ml was collected to be transferred to flask n°2. After homogenizing the flask n°2 as well, 1 ml was transferred to flask n°3 and so on until flask n°10. This procedure was carried out for each of the samples, in two series, one of which was inoculated with 1 ml of reference *Escherichia coli* and the other with *Staphylococcus aureus*.

All flasks were incubated at 35 °C for 24h. Visual observation of growth after incubation was impaired by the turbidity of some samples, and all samples were seeded on a PCA plate. The plates were incubated in a bacteriological oven at 35 °C for 24 hours and then, analysis occurred with the presence or absence of bacterial growth.

### 3.5.3 Microbiological Test Results

Following the described methodology, the results are presented in Figure 13 containing the NCCH/B biocomposite and both standards NCCH and Buriti oil. Reduction

of growth from n°7 vial plate onward was observed for all positive samples, regardless of the bacterium tested. This decrease occurred around 20 to 30% of the growth for all samples tested. In these plates, it was not possible to count because the number of colonies was much more than 300 CFU (Colony Forming Unit)/ml. No growth was observed from vial n°4 to *S. aureus* of NCCH/B, from vial n°5 of Buriti oil and vial n°6 of NCCH samples. However, the absence of growth for *E. coli* occurred from n°9 for the NCCH/B and Buriti oil samples. In this study, for the NCCH sample, it was not possible to determine the MBC (Minimum Bactericidal Count) for *Escherichia coli*, probably due to the distinct mechanism of action, since it's a Gram-negative bacterium with a complex cell wall structure different from Gram-positive. As approached in literature, chitosan has a more antibacterial effect on Gram-negative bacteria, due to the positive surface provided from free amino groups and nanoparticulate chitosan has more bacteriostatic behavior (YOUNES et al, 2014). Due to the personalized microbiological test that was required to attend the potential of the biocomposite, the bacteriostatic behavior of nanochitosan couldn't achieve. The best results were obtained from NCCH/B biocomposite when compared to the standards NCCH and oil, as observed in Figure 13, with bacteriostatic effect identified in flasks with smaller amounts of the compound.

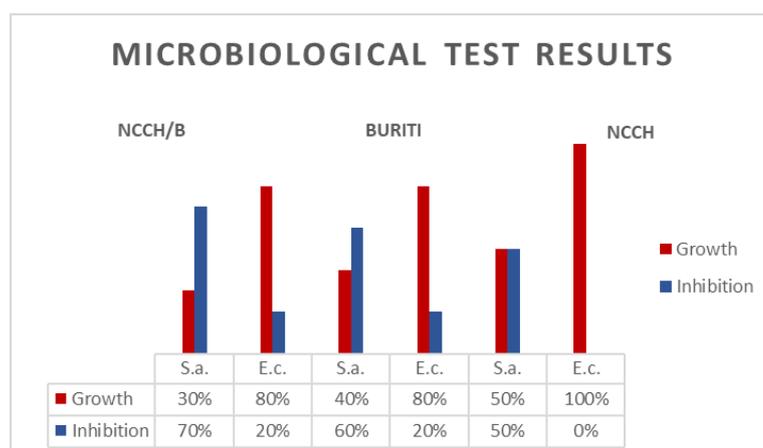


Figure 13: a graphical comparison of microbiological activity. Source: FIGUEIREDO et al, 2018.

#### 4 | CONCLUSION

Nanoparticulate chitosan has high polydispersity, reactivity and absorption potential due to its low crystallinity. This property allows the creation of new materials, such as the Buriti oil complexed with the biopolymer. The main of this work was to develop a new method of obtaining a biocomposite material through a new process, for application in regenerative medicine as a wound healing.

In the FTIR analyses, it was noticed that the characteristic peaks of both chitosan and Buriti oil are present in the NCCH/B, with preservation of the original structures, without a new different formation.

The SEM analyses showed characteristic agglomerations of chitosan,

an expected phenomenon due to the amorphous structure of nanoparticulate chitosan, and a velvety area related to the remaining oil was observed. The “swelling” effect of nanocrystalline chitosan suggests the encapsulation of the oil by the polymer, and the reduction of polydispersity is considerable. In Particle Size analyses, nanocrystalline chitosan showed a lower ratio compared to the biocomposite, still in nanoscale. This increase is interpreted as the encapsulation again. The reduction of polydispersity in NCCH/B biocomposite indicates more stability for the material.

It is still necessary to determine which specific group of the oil is bounding with the free amino groups of chitosan to assert as a complex indeed.

The Microbiological Tests indicated more inhibition of bacterial growth in the biocomposite than the standard chitosan and Buriti oil for *Staphylococcus aureus*. The low effect in *Escherichia coli*, as mentioned before, is a behavior of chitosan. In nanocrystalline chitosan, we have a bacteriostatic effect on Gram-negative bacteria. This observation corroborates with the complexation that this research approaches.

More analyses are being provided to characterize the complexation. *In vivo* tests are scheduled to confirm the healing potential and move a step forward as a new product.

## ACKNOWLEDGMENT

Our thanks to the Biomatter Lab and ULBRA University, that provided the research space and all the work colleagues involved in this project. Our gratitude to the partners of SENAI Technology Institute of Polymer Engineering for providing us with the analyses, and to Quimicamar Chemical Industries for their support.

## REFERENCES

ARAMWIT, Pornanong et al. **Introduction to Biomaterials for Wound Healing**. Book chapter. Wound Healing Biomaterials, Vol. 2, pp 03-36, 2016.

BROQUÁ, Júlia et al (2018). **Different Aspects of Chemical and Biochemical Methods for Chitin Production a Short Review**. *Nanomedicine and nanoscience research*. Vol. 2018, n. 2, p 1-11, 2018.

DHANDAYUTHAPANI, Brahateeswaram et al. **Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review**. *International Journal of Polymer Science*. Vol. 2011, n. 290602, p 1-19. 2011.

FRANCO, Patrícia Bataglini. **Desenvolvimento e Caracterização de Membranas de Quitosana e Casca de Banana Verde para Cicatrização de Feridas Cutâneas**. 2014. 69 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL). Poços de Caldas – MG, 2014.

FREITAS, Miriam Luisa Faria. **Preparo e Caracterização de Emulsões e Microcápsulas de Óleo de Buriti (*Mauritia Flexuosa*) Utilizando Isolado Proteico de Soja e Pectina de Alta Metoxilação como Estabilizantes**. 2018. 177 p. Tese (doutorado). Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto. 2018.

HOSSEINI, S. F.; ZANDI, M.; REZAEI, M.; FARAHMANDGHAVI, F. **Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study.** *Carbohydrate Polymers*, v. 95, p. 50–56, 2013.

KUMIRSKA, Jolanta et al. (2010) **Application of Spectroscopic Methods for Structural Analysis of Chitin and Chitosan.** *Marine Drugs*, Vol. 8, n. 5, p. 1567-1636. 2010.

MERCURIO, Daiane Garcia. **Caracterização da Pele Fotoenvelhecida, Desenvolvimento e Eficácia Clínica de Formulações Dermocosméticas por Técnicas de Biofísica e Análise de Imagem.** 2015. 206 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

OLIVEIRA GONZALEZ, Ana Cristina. **Wound healing – A literature review.** *Anais Brasileiros de Dermatologia. An. Bras. Dermatol.* Rio de Janeiro, vol 91, nº.5, p. 614-620, 2016.

OPLUSTIL, Carmen Paz. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica.** 3 ed. São Paulo: Sarvier. 2010. 544 p.

PIGHINELLI, Luciano et al. **Application of Chitosan and Buriti Oil (Mauritia Flexuosa L.) in Skin Wound Healing.** *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering*, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2017.

PIGHINELLI, Luciano et al. **Structure and Properties of Nanocrystalline Chitosan.** *J Appl Biotechnol Bioeng.* Vol. 1, n. 1, p 1-8. 2016.

ROMERO, Elizabeth Ramos. **Pesquisa e desenvolvimento de emulsões à base de óleos vegetais (buriti, cenoura e urucum) e bases auto emulsionantes aditivadas de óleo de melaleuca e ácido salicílico para o tratamento de pele acneica.** 2017. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

SARAIVA, Nicholas Allain. **Manejo Sustentável e Potencial Econômico da Extração do Buriti nos Lençóis Maranhenses.** 2009. 129 p. Dissertação (Mestrado). Centro de Desenvolvimento Sustentável, Universidade de Brasília, Brasília. 2009.

SOUZA, J. R.; MOURA, M. R.; CORRÊA, D. S.; MATTOSO, L. H. C. **Obtenção e caracterização de nanopartículas poliméricas ativas contendo óleo essencial de canela.** 21º CBECIMAT – Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciências dos Materiais, Cuiabá, MT, 2014.

WHO. **The World Health Report 2017: Primary Health Care Now More Than Ever.** Geneva: World Health Organization, 2017. 119 p. Disponível em: [http://www.who.int/gho/publications/world\\_health\\_statistics/2017/EN\\_WHS2017\\_TOC.pdf](http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2017/EN_WHS2017_TOC.pdf).

YOUNES, I. et al. **Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities.** *International Journal of Food Microbiology*, 2014.

## PORPHYROMONAS GINGIVALIS NA PERIODONTITE: POR QUE ESTUDAR SEUS FATORES DE VIRULÊNCIA COM FERRAMENTAS *IN SILICO*?

### Ellen Karla Nobre dos Santos-Lima

Universidade Federal da Bahia, Programa de Pós-graduação em Imunologia  
Salvador – Bahia

### Larissa de Mattos Oliveira

Universidade Estadual de Feira de Santana,  
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia  
Feira de Santana – Bahia

### Michelle Miranda Lopes Falcão

Universidade Estadual de Feira de Santana,  
Departamento de Saúde  
Feira de Santana – Bahia

### Manoelito Coelho dos Santos Junior

Universidade Estadual de Feira de Santana,  
Departamento de Saúde  
Feira de Santana – Bahia

### Márcia Tosta Xavier

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública,  
Curso de Odontologia  
Salvador – Bahia

### Soraya Castro Trindade

Universidade Estadual de Feira de Santana,  
Departamento de Saúde  
Feira de Santana – Bahia

**RESUMO:** *Porphyromonas gingivalis* é um dos principais microrganismos envolvidos na etiologia da periodontite. Induz a inflamação, mas também evade a resposta imune, devido aos seus fatores de virulência, como

gingipaínas, HmuY e neuraminidase. Estudos sobre a imunogenicidade de seus fatores de virulência podem contribuir para o entendimento da resposta do hospedeiro à infecção. Dessa forma, a presente revisão aborda tais proteínas e a relevância de se utilizar ferramentas *in silico* em estudos dos fatores de virulência de *P. gingivalis*, os quais podem esclarecer a patogênese, a evolução e a influência em condições sistêmicas da periodontite, bem como auxiliar a emissão do prognóstico da doença e o tratamento de casos refratários.

**PALAVRAS-CHAVE:** doença periodontal, resposta imune, imunoinformática.

### PORPHYROMONAS GINGIVALIS IN PERIODONTITIS: WHY STUDY ITS VIRULENCE FACTORS WITH *IN SILICO* TOOLS?

**ABSTRACT:** *Porphyromonas gingivalis* is one of the main microorganisms involved in the etiology of periodontitis. It induces inflammation, but it also evades the immune response, due to its virulence factors, such as gingipains, HmuY and neuraminidase. Studies on the immunogenicity of its virulence factors may contribute to the understanding of the host's response to infection. The present study aimed to conduct a literature review to comprehensively

investigate these proteins and the relevance of using *in silico* tools to investigations of *P. gingivalis* virulence factors that can better clarify the pathogenesis and the progression of periodontitis, as well as can help to determine the prognosis of the disease and the more appropriate treatment in refractory cases.

**KEYWORDS:** periodontal disease, immune response, immunoinformatics.

## 1 | INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença multifatorial que acomete os tecidos de proteção e suporte do dente. Pode ocasionar a perda das unidades dentárias acometidas devido à destruição de fibras colágenas e à reabsorção do osso alveolar. Trata-se de uma doença progressiva, caracterizada clinicamente por inflamação gengival, sangramento à sondagem do sulco gengival, perda de inserção periodontal e do osso alveolar e por bolsa periodontal (CATON *et al.*, 2018).

Sua etiopatogenia está relacionada à resposta imune inata e adaptativa diante da presença de um biofilme subgengival sinérgico e disbiótico (HAJISHENGALLIS & LAMBRIS, 2012; HAJISHENGALLIS & LAMONT, 2012). A partir da interação do biofilme disbiótico no ambiente subgengival, poderá ocorrer alteração no equilíbrio da produção de mediadores inflamatórios e, assim, a progressão da doença (ZHOU *et al.*, 2017). Dentre os microrganismos patogênicos presentes no biofilme, destaca-se *Porphyromonas gingivalis*, considerado um patógeno-chave na disbiose oral (HAJISHENGALLIS, 2014).

O desenvolvimento de mecanismos específicos de interação do patógeno com o seu hospedeiro (ABDI *et al.*, 2017) fortalece a necessidade de compreender de que forma as moléculas estruturais e metabólicas sintetizadas por *P. gingivalis* contribuem para o desenvolvimento da doença periodontal (NAKAGAWA *et al.*, 2006; GUO *et al.*, 2010; SMALLEY & OLCZAK, 2017). Do mesmo modo, justifica-se o estudo de moléculas expressas pelo hospedeiro em resposta à infecção pelo periodontopatógeno, diante da possibilidade da ocorrência de dano tecidual (MOUTSOPOULOS *et al.*, 2012).

O estudo *in silico* é uma ferramenta capaz de auxiliar na compreensão das interações moleculares. Assim, tal abordagem pode ser utilizada para os fatores de virulência, buscando alvos terapêuticos (CUENO *et al.*, 2014) e buscando compreender sua interação com o sistema imune do hospedeiro. As gingipaínas, o sideróforo HmuY e a neuraminidase são exemplos de proteínas sintetizadas por *P. gingivalis*, as quais são consideradas fatores de virulência, contribuindo para sua capacidade de induzir a periodontite (GUO *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2012; CARVALHO-FILHO *et al.* 2016; DASHPER *et al.*, 2017).

Identificar peptídeos com atividade imunogênica em tais fatores utilizando abordagens *in silico* pode contribuir para a compreensão da influência do microrganismo na etiologia e patogênese da periodontite, bem como para o entendimento dos mecanismos de resposta do hospedeiro à infecção. Dessa forma, a presente revisão

narrativa da literatura aborda tais proteínas e a relevância de se utilizar ferramentas *in silico* para estudo dos fatores de virulência de *P. gingivalis*.

## 2 | REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *Porphyromonas gingivalis*, microbioma oral e modelo *in silico*

*Porphyromonas gingivalis* é uma bactéria pertencente ao filo *Bacteroidetes* (SHAH & COLLINS, 1988). É um bacilo Gram-negativo, anaeróbio estrito, imóvel, proteolítico e forma colônias marrons ou negras em ágar sangue (MAYER *et al.*, 2013). Linhagens de *P. gingivalis* tiveram seu genoma sequenciado para análises comparativas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/714>). A linhagem ATCC 33277 (isolada de gengiva humana) é considerada menos virulenta e é utilizada para caracterização patofisiológica do microrganismo (NAITO *et al.*, 2008). Seu genoma foi publicado (NCBI Reference Sequence: NC\_010729.1), bem como, as sequências de suas proteínas e de seus epítomos candidatos têm sido depositadas em bancos de dados públicos *online*, como o do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e o do *Immune Epitope Database* (IEDB) (NAITO *et al.*, 2008; BITTNER-EDDY *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2016; LEONE *et al.*, 2018). O NCBI apresentou 7.320 itens referentes a proteínas dessa linhagem e o IEDB apresentou apenas 53 epítomos, em 22 de junho de 2018.

Em estudos clássicos, *P. gingivalis* foi agrupado no “complexo vermelho”, junto a *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*. Esse grupo apresentou uma forte relação positiva com os indicadores profundidade de bolsa periodontal e sangramento à sondagem e teve sua colonização precedida pelos microrganismos do “complexo laranja” (*Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum*, *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Streptococcus constellatus*, *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis* e *Campylobacter rectus*). O biofilme subgengival de indivíduos adultos com periodontite exibiu uma proporção maior de espécies dos complexos vermelho e laranja, as quais foram detectadas em maior número em bolsas  $\geq 3$ mm. O biofilme subgengival analisado apresentou contagem mais alta de *P. nigrescens*, *P. intermedia*, *T. forsythia* e *P. gingivalis*. E os sítios que abrigavam *P. gingivalis* exibiram a maior média de profundidade de bolsa periodontal. Além disso, *P. intermedia* e *P. gingivalis* foram detectados em sítios supragengivais sem concomitante detecção subgengival (SOCRANSKY *et al.*, 1998; XIMÉNEZ-FYVIE, HAFFAJEE & SOCRANSKY, 2000).

Desde então, os conceitos de sucessão microbiana e de interação recíproca desenvolvem-se e enfatizam a importância do relacionamento entre os microrganismos (*quorum sensing*), entres esses e o ecossistema bucal e entre esses e a resposta imune do hospedeiro na doença periodontal. Tal desenvolvimento ocorreu, principalmente, com

o auxílio dos métodos moleculares para acessar o microbioma oral e da bioinformática para analisar e ajudar a compreender os dados gerados (SOCRANSKY & HAFFAJJE, 2005; PLANČAK, MUSIĆ & PUHAR, 2015; GUVEN-MAIOROV, TSAI & NUSSINOV, 2017). Diante da complexidade do microbioma oral (PROCTOR *et al.*, 2018), entender como os microrganismos atuam sinergicamente em um mecanismo de disbiose oral amplia nosso conhecimento sobre a doença periodontal e suas implicações sistêmicas. Nesse cenário, *P. gingivalis* é considerado um patógeno-chave por conseguir interferir na simbiose oral (HAJISHENGALLIS, 2014; 2015; FLETCHER, 2018).

Sabe-se que modelos *in silico* são utilizados para a compreensão de sistemas biológicos, bem como para selecionar, complementar e inspirar os experimentos laboratoriais necessários (KOLLMANN & SOURJIK, 2007; SETTY, 2014; BRODLAND, 2015). Nesse contexto, a imunoinformática traz avanços na imunologia e pode contribuir para a compreensão da resposta imune (LEFRANC, 2014; QIU *et al.*, 2018). A imunoinformática traz ferramentas que proporcionam uma análise ampla dos fatores de virulência de *P. gingivalis* e de outros patógenos periodontais, além disso, contribui para a compreensão da interação entre o microbioma oral e seu hospedeiro. A análise *in silico* possibilita, por exemplo, a predição e a seleção de peptídeos imunogênicos antes de serem sintetizados e testados quanto ao seu potencial biotecnológico, o que diminui os custos na prospecção de moléculas promissoras.

## **2.2 Porphyromonas gingivalis e seus fatores de virulência**

Apenas uma minoria de espécies bacterianas possui a capacidade de causar doenças em humanos e um número relativamente pequeno de genes, os genes de virulência, são responsáveis pela diferença entre um patógeno e outro microrganismo não patogênico estreitamente relacionado. Os produtos desses genes são os fatores de virulência (ALBERTS *et al.*, 2010). Os fatores de virulência dos microrganismos periodontais subdividem-se, basicamente, em fatores que promovem a colonização; toxinas e enzimas que degradam os tecidos do hospedeiro; e mecanismos que protegem as bactérias patogênicas do hospedeiro (TEUGHELIS *et al.*, 2011).

Em sua interação com o sistema imune do hospedeiro, *P. gingivalis* apresenta fatores de virulência que se destacam, tais como capacidade de internalização em células não fagocíticas, polissacarídeos de superfície resistentes ao sistema complemento, fímbrias, lipopolissacarídeo (LPS), proteases (e.g. gingipaínas) que degradam moléculas sinalizadoras e citocinas (PRESHAW & TAYLOR, 2011; DASHPER *et al.*, 2017), a lipoproteína HmuY (CARVALHO-FILHO *et al.*, 2016) e a neuraminidase (XU *et al.*, 2017). A resposta inflamatória do hospedeiro decorrente da infecção por *P. gingivalis* tem como consequência o dano tecidual. Portanto, o estudo do comportamento da célula humana diante do fator de virulência e a mensuração dos níveis, locais e sistêmicos, de moléculas pro e anti-inflamatórias são estratégias empregadas na pesquisa em Periodontia (CARVALHO-FILHO *et al.*, 2013; GÜMÜŞ *et*

al.; KATO *et al.*, 2014).

As proteases são secretadas por *P. gingivalis* para prover nutrientes ao degradar proteínas do hospedeiro, como proteínas estruturais (e.g. colágeno), proteínas do sistema complemento e anticorpos. As cisteínoproteases, denominadas gingipaínas, degradam componentes do sistema complemento, inclusive o fator B, contribuindo para evasão da resposta imune (TEUGHELIS *et al.*, 2011; MAYER *et al.*, 2013). Murakami *et al.* (2004) observaram a diminuição da expressão de alguns fatores de virulência de *P. gingivalis* ATCC 33277, incluindo gingipaínas, com o aumento da temperatura de 37 a 40°C em cultura. Essa característica pode contribuir para evasão da resposta imune no sítio periodontal inflamado, visto que adotar um fenótipo menos inflamatório favorece a sobrevivência de *P. gingivalis*.

Outro fator de virulência relevante, a neuraminidase (sialidase) é expressa por patógenos, incluindo *P. gingivalis*, para a aquisição de ácidos siálicos a partir de sialoglicoconjugados do microambiente (HONMA *et al.*, 2011; GUALDI *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2012; KURNIYATI *et al.*, 2013). Além de serem nutrientes, os ácidos siálicos são incorporados à estrutura bacteriana, ajudando a mimetizar a célula hospedeira e confundindo a resposta imune (LI *et al.*, 2012; STAFFORD *et al.*, 2012). Além disso, assim como outros patógenos (SHTYRYA *et al.*, 2009; BANERJEE *et al.*, 2010; FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2015), *P. gingivalis* pode utilizar a sialidase para seu mecanismo de invasão celular.

Componentes estruturais e metabólicos de *P. gingivalis* constituem fatores de virulência que podem desencadear a resposta imune humoral em humanos. Indivíduos com periodontite apresentaram níveis séricos mais elevados de IgG que reconhece o extrato total sonicado de *P. gingivalis* e a proteína HmuY, enquanto indivíduos sem periodontite exibiram baixa imunorreatividade para esses antígenos (FRANCA *et al.*, 2007; TRINDADE *et al.*, 2008; 2012a). O extrato total *P. gingivalis* constitui-se, basicamente, em proteínas somáticas e de membrana. Tal extrato sonicado de *P. gingivalis* ATCC 33277 e frações proteicas obtidas após *Fast Performance Liquid Chromatography* (FPLC) foram capazes de induzir resposta humoral em pacientes com diferentes tipos de condição periodontal e as frações cromatográficas apresentaram distintos perfis de resposta em Western Blotting. Diferentes níveis de imunoglobulinas A e G e subclasses de IgG foram encontrados em soros de indivíduos com gengivite e periodontite (TRINDADE *et al.*, 2008). O sequenciamento e a identificação de peptídeos antigênicos em fatores de virulência presentes nas frações cromatográficas de *P. gingivalis* podem contribuir para a compreensão da influência deste patógeno na etiologia da doença periodontal.

### 2.3 Fator de virulência gingipaína

As gingipaínas são as principais proteases de *P. gingivalis* (GUO *et al.*, 2010) e uma das suas principais funções é a aquisição de ferro, um nutriente essencial

para essa bactéria (SMALLEY & OLCZAK, 2017). Imamura (2003) revisou a função das endopeptidases *trypsin-like* de *P. gingivalis*, as gingipaínas, na patogênese da doença periodontal, observando que elas contribuem para a evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro.

As gingipaínas pertencem à família das proteases de cisteína, que utilizam um sítio ativo da cisteína residual para catálise (BARRETT & RAWLINGS, 2001). São denominadas Arg-gingipaínas (RgpA e RgpB) ou Lys-gingipaína (Kgp) de acordo com sua capacidade de clivar Arg-xaa ou Lys-xaa. Contudo, as gingipaínas são multifuncionais, apresentando funções de adesão, degradação tecidual e evasão das respostas do hospedeiro, além de contribuírem para a colonização de outros patógenos (TEUGHELIS *et al.*, 2011; MAISETTA *et al.*, 2011; BAO *et al.*, 2014; BENGTTSSON, KHALAF & KHALAF, 2015; CHAIYARIT *et al.*, 2018).

Gingipaínas promovem permeabilidade vascular através da liberação de bradicinina, o que contribui para a produção de fluido gengival e formação de edema nos sítios periodontais infectados, suprimindo a nutrição bacteriana. Kgp é a principal gingipaína envolvida na degradação de fibrinogênio, contribuindo para a tendência ao sangramento da gengiva doente (IMAMURA, 2003). As gingipaínas, especialmente Kgp, atuam na degradação de junções de adesão das células epiteliais, o que pode contribuir para a invasão do tecido conjuntivo periodontal por *P. gingivalis* (KATZ *et al.*, 2002). Por essas e outras funções, Kgp é considerada um dos principais fatores de virulência de *P. gingivalis* (de DIEGO *et al.*, 2014). O gene *kgp* da linhagem ATCC 33277 codifica uma endopeptidase composta por 1723 aa, que pode ser clivada em quatro cadeias - a subunidade catalítica e três adesinas (39kDa, 15kDa e 44kDa) - e é secretada no meio extracelular (<http://www.uniprot.org/uniprot/B2RLK2>).

## 2.4 A lipoproteína HmuY

A lipoproteína HmuY é específica de *P. gingivalis* e anticorpos anti-HmuY não reconhecem proteínas homólogas em outros periodontopatógenos (OLCZAK *et al.*, 2010; ŚMIGA *et al.*, 2015). HmuY apresenta-se associada à membrana externa de *P. gingivalis* e é também excretada; sendo, promissora, estudada em sua atividade imunogênica (OLCZAK *et al.*, 2008; WÓJTOWICZ *et al.*, 2009; TRINDADE *et al.*, 2012a; TRINDADE *et al.*; CARVALHO-FILHO *et al.*, 2013).

HmuY foi previamente revisada por Carvalho-Filho *et al.* (2016) e Smalley & Olczak (2017). Assim como as gingipaínas, é uma proteína diretamente envolvida na aquisição de ferro pelo patógeno, porém é produzida quando o nutriente se apresenta em baixa concentração no microambiente (SMALLEY & OLCZAK, 2017). Em células mononucleadas do sangue periférico humanas, HmuY é capaz de induzir morte celular por apoptose tardia e necrose, induzir a produção das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-10 e inibir a produção de IL-8 (TRINDADE *et al.*, 2012a; b).

Embora *P. gingivalis* seja tipicamente um patógeno extracelular que induz níveis

mais altos de citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-22 e IL-23 no hospedeiro (MOUTSOPOULOS *et al.*, 2012), tem a capacidade de invadir células não-fagocíticas do hospedeiro como um de seus fatores de virulência (OLSEN & PROGULSKE-FOX, 2015) e de sobreviver em células fagocíticas, utilizando a proteína HmuY no mecanismo de sobrevivência em macrófagos (GMITEREK *et al.*, 2016). Portanto, esse mecanismo de evasão da resposta imune merece ser mais investigado do ponto de vista da resposta imune intracelular.

## 2.5 A neuraminidase de *Porphyromonas gingivalis*

A neuraminidase é uma sialidase, enzima que reconhece resíduos de ácido siálico presentes nas glicoproteínas e nos glicolípídeos das células do hospedeiro e do microambiente. O ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac), o ácido siálico mais estudado como nutriente, possui atividade antioxidante pela reação de redução do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), atuando como limpador do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em condições fisiológicas, podendo neutralizar sua citotoxicidade. Tal reação pode envolver o resíduo presente na cadeia glicídica e ocorrer em variação de pH (IIJIMA *et al.*, 2004; 2007).

A adição de ácido siálico, a sialilação, é uma das etapas da glicosilação, um dos mecanismos de modificação de proteínas para regulação de sua atividade (NELSON & COX, 2004a; b). Periodontopatógenos como *T. forsythia* e *P. gingivalis* utilizam a glicosilação de suas proteínas para evadir a resposta imune e, assim, persistir no hospedeiro causando destruição periodontal (SETTEM *et al.*, 2013).

Moncla *et al.* (1990) identificaram a atividade de sialidase em *P. gingivalis* (ATCC 33277) ao estudarem anaeróbios Gram-negativos. No entanto, atualmente, estudos da sialidase de *P. gingivalis* ainda são escassos (XU *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2018), comparados a estudos da gingipaína. Aruni *et al.* (2011) observaram três genes relacionados à atividade de sialidase no genoma de *P. gingivalis* W83; destes PG0352 tinha sido anotado como gene hipotético para sialidase e foi confirmado após suas análises *in silico* e *in vitro*. Aruni *et al.* (2011) e Li *et al.* (2012) alinharam as sequências de aminoácidos codificadas pelo gene NanH presente em outras espécies bacterianas, inclusive em *T. forsythia*, em busca de correspondência em *P. gingivalis*. O alinhamento das sequências mostrou que a porção C-terminal da proteína codificada por PG0352 possui um domínio catalítico conservado de neuraminidase, que consiste em um motivo RIP e três motivos Asp-box (LI *et al.*, 2012).

No estudo realizado por Aruni *et al.* (2011), observou-se que a atividade dessa sialidase e das duas sialoglicoproteases relacionadas pode estar envolvida na regulação da atividade de gingipaína e de outros fatores de virulência. Com a alteração da expressão dos três genes (incluindo PG0352), houve a diminuição da atividade de gingipaína, provavelmente por deficiência na sialilação. O mutante para PG0352 utilizado por estes autores apresentou redução de 5% da atividade de sialidase. Li *et al.* (2012) demonstraram que a inativação de PG0352 aboliu completamente a atividade

de neuraminidase, o que sugere que a enzima codificada seja a única neuraminidase de *P. gingivalis*.

O gene PG0352 (*P. gingivalis* W83) codifica uma exo- $\alpha$ -neuraminidase que contribui para formação do biofilme, para a biossíntese da cápsula bacteriana e para a patogenicidade. A mutação deste gene implicou na formação de uma cápsula deficiente, tornando o patógeno mutante menos resistente à ação do complemento. Além disso, os patógenos mutantes apresentaram reduzida virulência em camundongos, após injeção subcutânea (Li *et al.*, 2012). Mutantes isogênicos apresentaram mais sensibilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que o tipo selvagem e foi observada uma alteração na parede celular em tais mutantes, enquanto que o tipo selvagem apresentou uma parede celular intacta (ARUNI *et al.* 2011).

A neuraminidase codificada por PG0352 possui 526 aminoácidos, com uma massa molecular predita de 58,5 kDa, além disso, apresenta um peptídeo de sinalização em sua porção N-terminal, sugerindo ser secretada (LI *et al.*, 2012). Sua modelagem *in silico* permitiu classificá-la estruturalmente em BNR-neuraminidase (ARUNI *et al.*, 2011). O gene PG0352 corresponde a PGN\_1608 em *P. gingivalis* ATCC 33277 (Acesso *GenBank*: 6330303) (NAITO *et al.*, 2008), cuja neuraminidase também possui 526 aa (Acesso *GenBank*: BAG34127.1).

## 2.6 Peptídeos antigênicos de *Porphyromonas gingivalis*

Antígeno é qualquer molécula ou patógeno capaz de promover uma resposta imune, podendo ser um vírus, um fragmento de parede celular bacteriana, uma proteína ou outra macromolécula. Um antígeno complexo pode se ligar a diferentes anticorpos e cada anticorpo ou receptor de célula T liga-se a uma estrutura molecular particular no antígeno, chamada de determinante antigênico ou epítopo (NELSON & COX, 2004c).

As células apresentadoras de antígeno (APC) expressam em sua superfície as moléculas do MHC que se ligam a peptídeos. A maioria dos linfócitos T reconhece apenas peptídeos lineares curtos, pois os receptores de antígenos das células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> são específicos para antígenos apresentados por moléculas do MHC. Além disso, as células T reconhecem peptídeos lineares e não determinantes de conformação de antígenos proteicos. As CD4<sup>+</sup> reconhecem peptídeos provenientes de proteínas extracelulares, apresentados pelas moléculas MHC de classe II (ROCHA & NEEFJES, 2008; VYAS *et al.*, 2008).

Epítopos imunodominantes candidatos de gingipaínas foram testados em camundongos sob a hipótese que tais peptídeos, que se ligam ao MHC II I-Ab, seriam apresentados às células T CD4<sup>+</sup> durante a colonização oral por *P. gingivalis*. As sequências das proteínas Kgp e RgpA de ATCC 33277 foram analisadas para a triagem desses peptídeos com atividade imunogênica, os quais foram depositados no banco de dados público *online* IEDB (<http://www.iedb.org/sourceOrgId/431947>). O peptídeo na posição 467-477 de Kgp (ID 190728), por exemplo, obteve resultado positivo para

produção de IL-17A e IFN- $\gamma$  quando injetado em *Mus musculus* (<http://www.iedb.org/epld/190728>) (BITTNER-EDDY *et al.*, 2013). Outros peptídeos de Kgp de *P. gingivalis* W50 (ID 170347 / 173279) foram testados em *M. musculus* BALB/c, seguindo-se por reestimulação *in vitro*, com resultado positivo na proliferação de células T (3H-timidina). O peptídeo (ID 170347) também apresentou resultado positivo na produção de IFN- $\gamma$  e de IL-4 (TAM *et al.*, 2008).

Epítopos de Kgp e da neuraminidase de *P. gingivalis* ATCC 33277 foram recentemente obtidos por análise *in silico* das sequências proteicas, testados e depositados no IEDB (Kgp: reference ID 1032999 / neuraminidase: reference ID 1033135). Nesse estudo, todos os peptídeos de Kgp testados foram reconhecidos por IgG presente no soro e o peptídeo Kgp12 fez melhor distinção entre os grupos com periodontite crônica e sem periodontite. Os peptídeos da neuraminidase apresentaram baixo reconhecimento por IgG, o que pode ser favorável para a permanência do patógeno no hospedeiro (SANTOS-LIMA *et al.*, dados não publicados). No IEDB, não foram identificados epítopos referentes à sialidase / neuraminidase de *P. gingivalis* até a publicação decorrente deste trabalho e HmuY ainda não possui epítopos depositados até 07 de novembro de 2018.

O peptídeo sintético Kgp12 conseguiu diferenciar indivíduos com gengivite de indivíduos com periodontite quanto aos níveis de IgG. Em cultura de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) humano, os peptídeos Kgp12, 17 e 18 induziram baixas concentrações de IFN- $\gamma$  e Kgp12 foi capaz de diferenciar a resposta entre indivíduos com e sem periodontite quanto a produção desta citocina pois as CMSP de indivíduos sem periodontite foram capazes de produzir maiores concentrações da citocina em presença deste peptídeo. Kgp12 também induziu a produção de IL-6 e IL-1 $\beta$  em CMSP dos mesmos indivíduos (SANTOS-LIMA *et al.*, dados não publicados).

Embora se saiba que a ligação ao MHC seja necessária, mas não suficiente para o reconhecimento do epítipo pelas células T, o uso das análises *in silico* para prever peptídeos imunogênicos mostra-se uma ferramenta útil para estudos de imunogenicidade de patógenos. A análise permite selecionar peptídeos para a síntese química e teste de imunogenicidade, reduzindo o tempo e o custo na busca por resultados promissores. Identificar peptídeos antigênicos em fatores de virulência de *P. gingivalis* pode contribuir para a compreensão da influência do microrganismo na etiologia da doença periodontal, bem como para o entendimento dos mecanismos de resposta do hospedeiro à infecção, visto que tais peptídeos podem ser sintetizados, utilizados em experimentos que avaliem a imunogenicidade do patógeno e podem ser ferramentas úteis em aplicações biotecnológicas para emissão assertiva do prognóstico da doença.

## 2.7 Triagem virtual

As técnicas de triagem virtual, através da utilização de métodos computacionais, também conhecidos pelo termo *in silico*, auxiliam na seleção de compostos orgânicos

promissores do ponto de vista biotecnológico (e.g. novos fármacos) (RODRIGUES *et al.*, 2012; CUENO *et al.*, 2014). Tais métodos podem ser amplamente aplicados à imunologia das doenças periodontais na prospecção de marcadores moleculares para diagnóstico / prognóstico e de peptídeos quimeras para candidatos vacinais; e para compreender a resposta frente aos diversos antígenos.

O conhecimento das estruturas de alvos macromoleculares ou de complexos do tipo ligante-receptor permite a aplicação de estratégias de planejamento de fármacos baseadas na estrutura do receptor (do inglês, *Structure-Based Drug Design - SBDD*). Em contrapartida, quando a estrutura do alvo estudado não é conhecida, métodos de planejamento de fármacos baseados na estrutura de ligantes (do inglês, *Ligand-Based Drug Design - LBDD*) podem ser utilizados, explorando propriedades e características de um conjunto de ligantes bioativos. O uso integrado dessas estratégias pode gerar informações úteis no planejamento de novos fármacos uma vez que os conhecimentos das estratégias se complementam (GUIDO, ANDRICOPULO & OLIVA, 2010).

Tendo em vista a priorização de moléculas com afinidade frente a um alvo molecular em estudo, é possível utilizar as estratégias de aplicação de filtros moleculares, triagens biológicas automatizadas em alta escala (do inglês, *High-Throughput Screening – HTS*) e a triagem virtual (do inglês, *Virtual Screening – VS*) em bancos de dados de estruturas (e.g. ZINC) que agregam compostos, os quais podem ser avaliados posteriormente através de ensaios biológicos (STERLING & IRWIN, 2015). Entre as abordagens baseadas na estrutura de ligantes, os modelos farmacofóricos têm sido empregados em estudos de triagem virtual (LIU, SUN & HU, 2012).

O farmacóforo inclui todas as principais características envolvidas na interação do ligante com o sítio receptor (RODRIGUES *et al.*, 2012). De acordo com a definição da *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)*, um modelo farmacofórico consiste em um conjunto de características estéricas e eletrônicas necessárias para garantir as interações intermoleculares ideais com um alvo biológico específico e modular uma resposta biológica (WERMUTH *et al.*, 1998). Os modelos farmacofóricos podem ser derivados de abordagens baseadas na estrutura do alvo ou em ligantes, dependendo da disponibilidade da estrutura tridimensional do sítio ativo do alvo. A elucidação de um modelo farmacofórico envolve três estágios principais: geração de possíveis modelos usando métodos baseados em estrutura ou ligantes; preparação da base de dados para a avaliação e avaliação dos modelos farmacofóricos (BRAGA & ANDRADE, 2013). Alguns programas como Catalyst, GALAHAD™, GASP e LigandScout são utilizados para a geração de modelos farmacofóricos.

Na construção do modelo farmacofórico baseado em ligantes, são utilizadas moléculas com atividade biológica conhecida, que funcionam como moldes para a triagem em bases de dados de novas entidades químicas com algum nível de similaridade físico-química e mecanismo de ação com estes moldes (RODRIGUES *et al.*, 2012). O modelo farmacofórico é construído através da sobreposição de uma série

de compostos ativos que reúnem características essenciais para a atividade (YANG, 2010).

Os cálculos de acoplamento molecular, por sua vez, consistem em estratégias baseadas na estrutura do receptor que permitem avaliar e diferenciar as diversas conformações e orientações que um mesmo ligante pode adotar no sítio do alvo, assim como estimar a afinidade de ligação dos complexos ligante-receptor (RODRIGUES *et al.*, 2012). Essa estratégia pode ser dividida em duas etapas principais: busca conformacional e pontuação das conformações geradas (DIAS & AZEVEDO, 2008; HUANG & ZOU, 2010). Os métodos de busca podem ser divididos em métodos sistemáticos (e.g. construção incremental); métodos estocásticos (e.g. algoritmo genético, Monte Carlo) e métodos de simulação (e.g. dinâmica molecular) (KITCHEN *et al.*, 2004).

Os métodos sistemáticos utilizam algoritmos que exploram os graus de liberdade das moléculas, normalmente, através de sua construção incremental através da fragmentação inicial da molécula no sítio receptor. A simulação se inicia com o posicionamento de um fragmento do ligante, denominado âncora, no sítio ativo do alvo molecular (RODRIGUES *et al.*, 2012). O programa DOCK utiliza um método sistemático de construção incremental, no qual as orientações dos ligantes são exploradas através da imagem negativa na superfície do receptor. A imagem é gerada na superfície de acesso ao solvente com a sobreposição de esferas, das quais são selecionadas aquelas que representam o sítio ativo da proteína (BROZELL *et al.*, 2012). O programa Surflex-Dock (JAIN, 2003) também é um exemplo desse método.

Os métodos estocásticos de busca permitem mudanças aleatórias, geralmente alterando um grau de liberdade da estrutura por vez. Exemplos de métodos estocásticos são o método Monte Carlo (MC) e os algoritmos genéticos ou evolutivos (BROOIJMANS & KUNTZ, 2003), os quais permitem simular operações genéticas, como mutações e recombinações. A conformação de uma molécula deve ser representada de modo a permitir que um processo evolucionário de mutação e seleção ocorra. Ou seja, todas as informações de ângulos de torção de ligações de uma molécula (“gene”) são armazenadas como uma sequência numérica (“cromossomo”) (RODRIGUES *et al.*, 2012). Os programas Autodock Vina e GOLD são exemplos da utilização do algoritmo genético como estratégia.

As funções de pontuação podem ser classificadas em três tipos: (1) funções baseadas em campos de força, (2) funções empíricas e (3) funções baseadas no conhecimento (CHENG *et al.*, 2012). (1) As funções baseadas em campos de força utilizam os potenciais de campos de força clássicos para calcular as interações intermoleculares não covalentes, de acordo com os potenciais de Lennard-Jones (interações estéreas) e de Coulomb (interações eletrostáticas) (SCHULZ-GASCH & STAHL, 2003). A função Grid Score é um exemplo da aplicação dessa abordagem. (2) As funções empíricas calculam a energia livre global através da introdução de parâmetros de ajuste que multiplicam termos que descrevem a energia de interação, ligações

de hidrogênio, contribuições entrópicas... (ELDRIDGE *et al.*, 1997; HUANG & ZOU, 2010; CHENG *et al.*, 2012). Programas como o AutoDock4, EADock e GOLD utilizam essas funções. (3) As funções com base no conhecimento calculam as interações do ligante com a macromolécula como a soma de dados estatísticos dos potenciais de pares atômicos de ligação entre o alvo e o ligante. Esses dados são obtidos a partir de complexos cristalográficos proteína-ligante ou ligante-ligante (CAPRA *et al.*, 2009).

Uma vez que as interações com alvos moleculares são de natureza dinâmica e, portanto, a flexibilidade é uma característica crucial para a identificação do modo de ligação, as simulações de Dinâmica Molecular (DM) são capazes de descrever uma variação do comportamento molecular (conteúdo da estrutura secundária, orientação de cadeias laterais, conformação de alças e energia de interação entre diferentes moléculas) em função do tempo. Segundo a IUPAC, a DM é um procedimento de simulação que consiste na computação do movimento dos átomos em uma molécula ou de átomos individuais ou moléculas em sólidos, líquidos e gases, de acordo com as leis de movimento de Newton (VERLI, 2014). Um dos pacotes de programas gratuitos de alto desempenho para realização das simulações de DM é o *GROningen MAchine for Chemical Simulation* (GROMACS) (ABRAHAM *et al.*, 2015). O campo de força GROMOS53A6, presente no GROMACS, é adequado para ser aplicado quando se deseja analisar um sistema solvatado, como o das proteínas globulares, pois seus parâmetros foram especialmente otimizados considerando o cálculo da energia livre da solvatação das cadeias laterais dos aminoácidos (OOSTENBRINK *et al.*, 2004). A avaliação de uma simulação de dinâmica molecular pode ser realizada através de módulos disponíveis no pacote GROMACS 5.1.2, como rms, rmsf, gyrate e Hbond.

Em outra abordagem de triagem *in silico*, pode-se prever peptídeos imunogênicos ao longo de uma sequência proteica, os quais podem ser sintetizados e testados *in vitro* e *in vivo*, reduzindo o tempo e o custo na busca por peptídeos promissores. O IEDB (VITA *et al.*, 2015) possui ferramentas gratuitas como a *MHC-II Binding Predictions* (<http://tools.immuneepitope.org/mhcii/>), a qual emprega diferentes métodos para prever epítomos que se liguem ao receptor MHC de classe II (WANG *et al.*, 2008; 2010).

Os métodos aqui descritos representam abordagens para compor estudos dos fatores de virulência dos patógenos associados à periodontite, buscando compreender a interação entre os patógenos e o sistema imune do hospedeiro (patogênese, evolução da doença), gerando potenciais marcadores para o prognóstico (e. g. o peptídeo sintético Kgp12, o qual conseguiu diferenciar indivíduos com gengivite de indivíduos com periodontite quanto aos níveis de IgG) e triando alvos terapêuticos específicos para serem usados em casos refratários, como em [Cueno \*et al.\* \(2014\)](#). Após a análise *in silico* de um fator de virulência, os peptídeos promissores sintéticos (MACHADO *et al.*, 2004), capazes de ser reconhecidos por anticorpos humanos e de induzir resposta imune em cultura de células humanas, podem auxiliar no estudo do fator de virulência e na busca pelo entendimento da patogenicidade de *P. gingivalis*.

### 3 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os fatores de virulência abordados apresentam influência na resposta imune do hospedeiro diante de *P. gingivalis*. Abordagens *in silico* para explorar a relação antígeno / hospedeiro com menor custo e com maior eficácia podem contribuir para a compreensão da influência do microrganismo na patogênese e na evolução da periodontite, bem como para o entendimento dos mecanismos de resposta do hospedeiro à infecção.

### 4 | AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Imunologia da UFBA, ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da UEFS, ao Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (ICS, UFBA) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia.

### REFERÊNCIAS

Abdi K, Chen T, Klein BA, Tai AK, Coursen J, Liu X, Skinner J, Periasamy S, Choi Y, Kessler BM, Palmer RJ, Gittis A, Matzinger P, Duncan MJ, Singh NJ. Mechanisms by which *Porphyromonas gingivalis* evades innate immunity. PLoS One 2017;12(8):e0182164.

Abraham MJ, Murtolad T, Schulzb R, Pála S, Smithb JC, Hessa B, Lindahla E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. SoftwareX 2015;1-2:19-25.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Patógenos, infecção e imunidade inata. In: Biologia molecular da célula. 5ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p.1485-1538.

Aruni W, Vanterpool E, Osbourne D, Roy F, Muthiah A, Dou Y, Fletcher HM. Sialidase and sialoglycoproteases can modulate virulence in *Porphyromonas gingivalis*. Infection and immunity 2011;79(7):2779-91.

Banerjee A, van Sorge NM, Sheen TR, Uchiyama S, Mitchell TJ, Doran KS. Activation of brain endothelium by *Pneumococcal* neuraminidase NanA promotes bacterial internalization. Cellular microbiology 2010;12(11):1576-88.

Bao K, Belibasakis GN, Thurnheer T, Aduse-Opoku J, Curtis MA, Bostanci N. Role of *Porphyromonas gingivalis* gingipains in multi-species biofilm formation. BMC Microbiol 2014;14:258.

Barrett AJ, Rawlings ND. Evolutionary lines of cysteine peptidases. Biol Chem 2001;382(5):727-733.

Bengtsson T, Khalaf A, Khalaf H. Secreted gingipains from *Porphyromonas gingivalis* colonies exert potent immunomodulatory effects on human gingival fibroblasts. Microbiol Res 2015;178:18-26.

Bittner-Eddy PD, Fischer LA, Costalonga M. Identification of gingipain-specific IA<sup>b</sup>-restricted CD4<sup>+</sup> T cells following mucosal colonization with *Porphyromonas gingivalis* in C57BL/6 mice. Molecular oral microbiology 2013;28:452-66.

Braga RC, Andrade CH. Assessing the Performance of 3D Pharmacophore Models in Virtual

- Screening: How Good are They? Current Topics in Medicinal Chemistry 2013;13:1-12.
- Brodland GW. How computational models can help unlock biological systems. Seminars in Cell & Developmental Biology 2015;47-48:62-73.
- Brooijmans N, Kuntz ID. Molecular recognition and docking algorithms. Annu Rev Biophys Biomol Struct 2003;32:335-373.
- Brozell SR, Mukherjee S, Balius TE, Roe DR, Case DA, Rizzo RC. Evaluation of DOCK 6 as a pose generation and database enrichment tool. J Comput Aided Mol Des 2012;26:749-773.
- Capra JA, Laskowski RA, Thornton JM, Singh M, Funkhouser TA. Predicting protein ligand binding sites by combining evolutionary sequence conservation and 3D structure. PloS Computational Biology 2009;5(12):e1000585.
- Carvalho-Filho PC, Gomes-Filho IS, Meyer R, Olczak T, Xavier MT, Trindade SC. Role of *Porphyromonas gingivalis* HmuY in immunopathogenesis of chronic periodontitis. Mediators Inflamm 2016;(2016):7465852.
- Carvalho-Filho PC, Trindade SC, Olczak T, Sampaio GP, Oliveira-Neto MG, Santos HA, Pereira BFP, Moura-Costa L, Xavier MT, Meyer R. *Porphyromonas gingivalis* HmuY stimulates expression of Bcl-2 and Fas by human CD3<sup>+</sup> T cells. BMC Microbiology 2013;13(1):206.
- Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, Mealey BL, Papapanou PN, Sanz M, Tonetti MS. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. J Clin Periodontol 2018;45(Suppl 20):S1-S8.
- Chaiyarit P, Jaresitthikunchai J, Phaonakrop N, Roytrakul S, Potempa B, Potempa J. Proteolytic effects of gingipains on trefoil factor family peptides. Clin Oral Invest 2018;22:1009-18.
- Cheng T, Li Q, Zhou Z, Wang Y, Bryant SH. Structure-based virtual screening for drug discovery: a problemcentric review. The AAPS Journal 2012;14(1)133-141.
- Cueno ME, Kamio N, Imai K, Ohya M, Tamura M, Ochiai K. Structural significance of the  $\beta$ 1K396 residue found in the *Porphyromonas gingivalis* sialidase  $\beta$ -propeller domain: a computational study with implications for novel therapeutics against periodontal disease. OMICS 2014;18(9):591-9.
- Dashper SG, Mitchell HL, Seers CA, Gladman SL, Seemann T, Bulach DM, Chandry PS, Cross KJ, Cleal SM, Reynolds EC. *Porphyromonas gingivalis* uses specific domain rearrangements and allelic exchange to generate diversity in surface virulence factors. Front. Microbiol 2017;8:48.
- de Diego I, Veillard F, Sztukowska MN, Guevara T, Potempa B, Pomowski A, Huntington JA, Potempa J, Gomis-Rüth FX. Structure and mechanism of cysteine peptidase gingipain K (Kgp), a major virulence factor of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis. J BiolChem 2014;289(46):32291-302.
- Dias R, Azevedo WF. Molecular docking algorithms. Current Drug Targets 2008;9(12):1040-1047.
- Eldridge MD, Murray CW, Auton TR, Paolini GV, Mee RP. Empirical scoring functions: I. The development of fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. Journal Computed-aided Molecular Design 1997;11(5):425-445.
- Fletcher HM. *Porphyromonas gingivalis*: the gift of community involvement. Mol Oral Microbiol 2018;33:111-2.
- Franca M, Moura-Costa L, Meyer RJ, Trindade SC, Tunes UR, Freire SM. Humoral immune response

to antigens of *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 in chronic periodontitis. J Appl Oral Sci 2007;15(3):213-9.

Freire-de-Lima L, Fonseca LM, Oeltmann T, Mendonça-Previato L, Previato JO. The trans-sialidase, the major *Trypanosoma cruzi* virulence factor: three decades of studies. Glycobiology 2015;25(11):1142-9.

Gmiterek A, Kłopot A, Wójtowicz H, Trindade SC, Olczak M, Olczak T. Immune response of macrophages induced by *Porphyromonas gingivalis* requires HmuY protein. Immunobiology 2016;221(12):1382-94.

Gualdi L, Hayre JK, Gerlini A, Bidossi A, Colomba L, Trappetti C, Pozzi G, Docquier JD, Andrew P, Ricci S, Oggioni MR. Regulation of neuraminidase expression in *Streptococcus pneumoniae*. BMC Microbiol 2012;12:200.

Guido RVC, Andricopulo AD, Oliva G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. Estudos avançados 2010;24:81-98.

Gümüş P, Nizam N, Lappin DF, Buduneli N. Saliva and serum levels of B-cell activating factors and tumor necrosis factor- $\alpha$  in patients with Periodontitis. J Periodontol 2014;85(2):270-80.

Guo Y, Nguyen K-A, Potempa J. Dichotomy of gingipains action as virulence factors: from cleaving substrates with the precision of a surgeons knife to a meat chopper-like brutal degradation of proteins. Periodontology 2000. 2010;54:15-44.

Guyen-Maiorov E, Tsai C-J, Nussinov R. Structural host-microbiota interaction networks. PLoS Comput Biol 2017;13(10):e1005579.

Hajishengallis G, Lambris JD. Complement and dysbiosis in periodontal disease. Immunobiology 2012;217(11):1111-6.

Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. Mol Oral Microbiol 2012;27(6):409-19.

Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. Trends Immunol 2014;35(1):3-11.

Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. Nature Reviews Immunology 2015;15:30-44.

Honma K, Mishima E, Sharma A. Role of *Tannerella forsythia* NanH sialidase in epithelial cell attachment. Infection and immunity 2011;79(1):393-401.

Huang SY, Zou X. Advances and challenges in protein-ligand docking. International Journal Molecular Science 2010;11(8):3016-3034.

Iijima R, Takahashi H, Ikegami S, Yamazaki M. Characterization of the reaction between sialic acid (N-acetylneuraminic acid) and hydrogen peroxide. Biol Pharm Bull 2007;30(3):580-2.

Iijima R, Takahashi H, Namme R, Ikegami S, Yamazaki M. Novel biological function of sialic acid (N-acetylneuraminic acid) as a hydrogen peroxide scavenger. FEBS Lett 2004;561:163-6.

Imamura T. The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. J Periodontol 2003;74(1):111-8.

Jain AN. Surflex: Fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine. *Journal of Medicinal Chemistry* 2003;46:499-511.

Kato H, Taguchi Y, Tominaga K, Umeda M, Tanaka A. *Porphyromonas gingivalis* LPS inhibits osteoblastic differentiation and promotes pro-inflammatory cytokine production in human periodontal ligament stem cells. *Archives of oral biology* 2014; 59:167-75.

Katz J, Yang Q-B, Zhang P, Potempa J, Travis J, Michalek SM, Balkovetz DF. Hydrolysis of epithelial junctional proteins by *Porphyromonas gingivalis* gingipains. *Infection and Immunity* 2002;70(5):2512-8.

Kitchen, DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3(11):935-949.

Kollmann M, Sourjik V. *In Silico* Biology: From Simulation to Understanding. *Current Biology* 2007;17(4):R132-4.

Kurniyati K, Zhang W, Zhang K, Li C. A surface-exposed neuraminidase affects complement resistance and virulence of the oral spirochaete *Treponema denticola*. *Mol Microbiol* 2013;89(5):842-56.

Lefranc M-P. Immunoglobulin and T Cell Receptor Genes: IMGT® and the Birth and Rise of Immunoinformatics. *Frontiers in Immunology* 2014;5:22.

Leone P, Roche J, Vincent MS, Tran QH, Desmyter A, Cascales E, Kellenberger C, Cambillau C, Roussel A. Type IX secretion system PorM and gliding machinery GldM form arches spanning the periplasmic space. *Nat Commun* 2018;30;9(1):429.

Li C, Kurniyati, Hu B, Bian J, Sun J, Zhang W, Liu J, Pan Y, Lia C. Abrogation of neuraminidase reduces biofilm formation, capsule biosynthesis, and virulence of *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity* 2012;80(1):3-13.

Li S, Yu Y, Yue Y, Liao H, Xie W, Thai J, Mikuls TR, Thiele GM, Duryee MJ, Sayles H, Payne JB, Klassen LW, O'Dell JR, Zhang Z, Su K. Autoantibodies From Single Circulating Plasmablasts React With Citrullinated Antigens and *Porphyromonas gingivalis* in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2016;68(3):614-26.

Liu M, Sun Z, Hu, W. Three-dimensional pharmacophore screening for fentanyl derivatives. *Neural Regeneration Research* 2012;7: 1398–1405.

Machado A, Liria CW, Proti PB, Remuzgo C, Miranda MTM. Sínteses química e enzimática de peptídeos: Princípios básicos e aplicações. *Quim Nova* 2004;27(5):781-9.

Maisetta G, Brancatisano FL, Esin S, Campa M, Batoni G. Gingipains produced by *Porphyromonas gingivalis* ATCC49417 degrade human- $\beta$ -defensin 3 and affect peptide's antibacterial activity in vitro. *Peptides* 2011;32(5):1073-7.

Mayer MPA, Suguimoto ESA, Teixeira SRL. Microbiologia da doença periodontal. In: Spolidorio DMP, Duque C. *Microbiologia e imunologia geral e odontológica*. v.1. São Paulo: Artes Médicas, 2013. p.91-99.

Moncla BJ, Braham P, Hillier SL. Sialidase (neuraminidase) activity among Gram negative anaerobic and capnophilic bacteria. *Journal of clinical microbiology* 1990; 28(3):422-5.

Moutsopoulos NM, Kling HM, Angelov N, Jin W, Palmer RJ, Nares S, Osorio M, Wahl SM. *P. gingivalis* promotes Th17 inducing pathways in chronic periodontitis. *J Autoimmun* 2012;39(4):294-303.

Murakami Y, Masuda T, Imai M, Iwami J, Nakamura H, Noguchi T, Yoshimura F. Analysis of major

virulence factors in *Porphyromonas gingivalis* under various culture temperatures using specific antibodies. *Microbiol Immunol* 2004;48(8):561-9.

Naito M, Hirakawa H, Yamashita A, Ohara N, Shoji M, Yukitake H, Nakayama K, Toh H, Yoshimura F, Kuhara S, Hattori M, Hayashi T, Nakayama K. Determination of the genome sequence of *Porphyromonas gingivalis* strain ATCC 33277 and genomic comparison with strain W83 revealed extensive genome rearrangements in *P. gingivalis*. *DNA Res* 2008;15(4):215-25.

Nakagawa I, Inaba H, Yamamura T, Kato T, Kawai S, Ooshima T, Amano A. Invasion of epithelial cells and proteolysis of cellular focal adhesion components by distinct types of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *Infect Immun* 2006;74(7):3773-82.

Nelson DL, Cox MM. Enzymes. In: Lehninger. Principles of Biochemistry. 4ed. New York: W. H. Freeman, 2004.p.190-237. a

Nelson DL, Cox MM. Carbohydrates and glycobiology. In: Lehninger. Principles of Biochemistry. 4ed. New York: W. H. Freeman, 2004.p.238-272. b

Nelson DL, Cox MM. Protein function. In: Lehninger. Principles of Biochemistry. 4ed. New York: W. H. Freeman, 2004. p.157-89. c

Olczak T, Sroka A, Potempa J, Olczak M. *Porphyromonas gingivalis* HmuY and HmuR: further characterization of a novel mechanism of heme utilization. *Arch Microbiol* 2008;189(3):197-210.

Olczak T, Wójtowicz H, Ciuraszkiewicz J, Olczak M. Species specificity, surface exposure, protein expression, immunogenicity, and participation in biofilm formation of *Porphyromonas gingivalis* HmuY. *BMC Microbiology* 2010;10:134.

Olsen I, Progulske-Fox A. Invasion of *Porphyromonas gingivalis* strains into vascular cells and tissue. *Journal of Oral Microbiology* 2015;7:28788.

Oostenbrink C, Villa A, Mark AE, Gunsteren WFV. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *Journal of computational chemistry* 2004;25:1656-1676.

Plančak D, Musić L, Puhar I. Quorum Sensing of Periodontal Pathogens. *Acta Stomatol Croat.* 2015;49(3):234-41.

Preshaw PM, Taylor JJ. Patogênese periodontal. In: Newman MG, Takei H, Klokkevold PR, Carranza FA. Carranza, periodontia clínica. 11ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p.210-35.

Proctor DM, Fukuyama JA, Loomer PM, Armitage GC, Lee SA, Davis NM, Ryder MI, Holmes SP, Relman DA. A spatial gradient of bacterial diversity in the human oral cavity shaped by salivary flow. *Nat Commun* 2018;9(1):681.

Qiu T, Yang Y, Qiu J, Huang Y, Xu T, Xiao H, Wu D, Zhang Q, Zhou C, Zhang X, Tang K, Xu J, Cao Z. CE-BLAST makes it possible to compute antigenic similarity for newly emerging pathogens. *Nat Commun* 2018;9(1):1772.

Rocha N, Neefjes J. MHC class II molecules on the move for successful antigen presentation. *EMBO J* 2008;27(1):1-5.

Rodrigues RP, Mantoani SP, de Almeida JR, Pinsetta FR, Semighini EP, da Silva VB, da Silva CHP. Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos. *Rev Virtual Quim* 2012;4(6):739-76.

Settem RP, Honma K, Stafford GP, Sharma A. Protein-linked glycans in periodontal bacteria:

prevalence and role at the immune interface. *Front. Microbiol* 2013;4,310:1-6.

Setty Y. In-silico models of stem cell and developmental systems. *Theoretical Biology & Medical Modelling* 2014;11:1.

Schulz-Gasch T, Stahl M. Binding site characteristics in structure-based virtual screening: evaluation of current docking tools. *Journal of Molecular Modeling* 2003;9(1):47-57.

Shah HN, Collins MD. Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides endodontalis* in a new genus, *Porphyromonas*. *Int J Syst Bacteriol* 1988;38:128-31.

Shtyrya YA, Mochalova LV, Bovin NV. Influenza virus neuraminidase: structure and function. *Acta Naturae* 2009;1(2):26-32.

Smalley JW, Olczak T. Heme acquisition mechanisms of *Porphyromonas gingivalis* – strategies used in a polymicrobial community in a heme-limited host environment. *Mol Oral Microbiol* 2017;32(1):1-23.

Śmiga M, Bielecki M, Olczak M, Smalley JW, Olczak T. Anti-HmuY Antibodies specifically recognize *Porphyromonas gingivalis* HmuY protein but not homologous proteins in other periodontopathogens. *PLoS One* 2015;10(2):e0117508.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998;25:134-44.

Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000 2005;38:135-87.

Stafford G, Roy S, Honma K, Sharma A. Sialic acid, periodontal pathogens and *Tannerella forsythia*: stick around and enjoy the feast! *Mol Oral Microbiol* 2012;27(1):11-22.

Sterling T, Irwin JJ. ZINC 15 – Ligand Discovery for Everyone. *J Chem Inf Model* 2015;55(11):2324-37.

Tam V, O'Brien-Simpson NM, Pathirana RD, Frazer LT, Reynolds EC. Characterization of T cell responses to the RgpA-Kgp proteinase-adhesin complexes of *Porphyromonas gingivalis* in BALB/c mice. *J Immunol* 2008;181:4150-8.

Teughels W, Quirynen M, Jakubovics N. Microbiologia periodontal. In: Newman MG, Takei H, Klokkevold PR, Carranza FA. Carranza, periodontia clínica. 11ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.p.251-94.

Trindade SC, Gomes-Filho IS, Meyer RJ, Vale VC, Pugliese L, Freire SM. Serum antibody levels against *Porphyromonas gingivalis* extract and its chromatographic fraction in chronic and aggressive periodontitis. *J Int Acad Periodontol* 2008;10(2):50-8.

Trindade SC, Olczak T, Gomes-Filho IS, Moura-Costa LF, Cerqueira EMM, Galdino-Neto M, Alves H, Carvalho-Filho PC, Xavier MT, Meyer R. Induction of interleukin (IL)-1b, IL-10, IL-8 and immunoglobulin G by *Porphyromonas gingivalis* HmuY in humans. *J Periodont Res* 2012;47:27-32. a

Trindade SC, Olczak T, Gomes-Filho IS, Moura-Costa LF, Vale VL, Galdino-Neto M, Alves H, Carvalho-Filho PC, Sampaio GP, Xavier MT, Sarmiento VA, Meyer R. *Porphyromonas gingivalis* antigens differently participate in the proliferation and cell death of human PBMC. *Archives of oral biology* 2012;57:314-20. b

Trindade SC, Olczak T, Gomes-Filho IS, Moura-Costa LF, Vale VC, Galdino-Neto M, Santos HA, Carvalho Filho PC, Stocker A, Bendicho MT, Xavier MT, Cerqueira EMM, Meyer R. *Porphyromonas gingivalis* HmuY-induced production of interleukin-6 and IL-6 polymorphism in chronic periodontitis. *J*

Periodontol 2013;84(5):650-5.

Verli H. Dinâmica Molecular. In: Bioinformática da Biologia à flexibilidade molecular. 1ed. São Paulo: SBBq, 2014. p.173-187.

Vita R, Overton JA, Greenbaum JA, Ponomarenko J, Clark D, Cantrell JR, Wheeler DK, Gabbard JL, Hix D, Sette A, Peters B. The immune epitope database (IEDB) 3.0. Nucleic Acids Res 2015;43(Database issue):D405-12.

Vyas JM, Van der Veen AG, Ploegh HL. The known unknowns of antigen processing and presentation. Nat Rev Immunol 2008;8(8):607-18.

Wang P, Sidney J, Dow C, Mothé B, Sette A, Peters B. A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. PLoS Comput Biol 2008;4(4):e1000048.

Wang P, Sidney J, Kim Y, Sette A, Lund O, Nielsen M, Peters B. Peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules. BMC Bioinformatics 2010;11:568.

Wermuth CG, Ganellin CR, Lindberg P, Mitscher LA. Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1997). Annu Rep Med Chem 1998;33:385-395.

Wójtowicz H, Guevara T, Tallant C, Olczak M, Sroka A, Potempa J, Sola M, Olczak T, Gomis-Rüth FX. Unique structure and stability of HmuY, a novel hemebinding protein of *Porphyromonas gingivalis*. PLoS Pathog 2009;5(5):e1000419.

Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Microbial composition of supra and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. J Clin Periodontol 2000; 27:722-32.

Xu X, Tong T, Yang X, Pan Y, Lin L, Li C. Differences in survival, virulence and biofilm formation between sialidase-deficient and W83 wild-type *Porphyromonas gingivalis* strains under stressful environmental conditions. BMC Microbiol 2017;17(1):178.

Yang S. Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances. Drug Discovery Today 2010;15:444-450.

Yang X, Pan Y, Xu X, Tong T, Yu S, Zhao Y, Lin L, Liu J, Zhang D, Li C. Sialidase deficiency in *Porphyromonas gingivalis* increases IL-12 secretion in stimulated macrophages through regulation of CR3, lncRNA GAS5 and miR-21. Front Cell Infect Microbiol 2018;8:100.

Zhou J, Yao Y, Jiao K, Zhang J, Zheng X, Wu F, Hu X, Li J, Yu Z, Zhang G, Jiang N, Li Z. Relationship between Gingival Crevicular Fluid Microbiota and Cytokine Profile in Periodontal Host Homeostasis. Front Microbiol 2017;8:2144.

## PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOSURFACTANTES PRODUZIDOS POR *Bacillus subtilis* A PARTIR DO EXTRATO AQUOSO DA ALGAROBA [*Prosopis juliflora* (SW) DC] COMO SUBSTRATO NÃO CONVENCIONAL

### **Adrielly Silva Albuquerque de Andrade**

Universidade Federal da Paraíba, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Mestrado, João Pessoa – PB.

### **Emanuele Cardoso Dias**

Universidade Federal da Paraíba, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Mestrado, João Pessoa – PB.

### **Napoleão José de Oliveira Neto**

Universidade Federal da Paraíba, Graduando em Biotecnologia, João Pessoa – PB.

### **Graciana Clécia Dantas**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Natal – RN.

### **Adna Cristina Barbosa de Sousa**

Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Biologia Celular e Molecular, João Pessoa – PB.

### **Andréa Farias de Almeida**

Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Biotecnologia, João Pessoa – PB.

**RESUMO:** Biossurfactantes são moléculas anfipáticas sintetizadas por microrganismos que agem em interfaces água/óleo ou óleo/água reduzindo as tensões superficiais e interfaciais entre as fases fluidas e assim tornando alguns compostos mais miscíveis. Apresentam alto custo de produção, consequência do valor do substrato e dos métodos de purificação

utilizados no processo industrial. A estratégia de substituição de substratos convencionais para sua produção (como glicose e sacarose) por substratos oriundos de fontes renováveis, mais baratos e ricos em nutrientes para o cultivo de microrganismos produtores de biossurfactantes é essencial para viabilizar sua produção em escala industrial. Dessa forma, foram realizados dois processos para produção de biossurfactantes: meio contendo sacarose (convencional), e o outro, o extrato aquoso obtido das vagens da algaroba [*Prosopis juliflora* (SW) DC.] como substrato para o desenvolvimento do *Bacillus subtilis*. Os cultivos foram acompanhados durante 96 horas e a produção do biossurfactante foi caracterizada pelos testes de emulsificação, purificação (centrifugação, precipitação ácida e extração líquido-líquido) e determinação da sua atividade antimicrobiana. Os métodos de precipitação ácida e extração líquido-líquido recuperaram uma produção de biossurfactantes de 0,064g/L e 1,208g/L, respectivamente, sacarose e extrato aquoso da algaroba. Além disso, os biossurfactantes produzidos demonstraram boa capacidade emulsificante quando colocados em contato com três compostos hidrofóbicos diferentes (óleo vegetal, óleo de motor e querosene) e atividade antimicrobiana com relação aos microrganismos *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* e *Pseudomonas sp.*

**PALAVRAS-CHAVE:** Emulsificantes, surfactina, atividade antimicrobiana e biorreatores

**ABSTRACT:** Biosurfactants are amphipathic molecules synthesized by microorganisms that act at water/oil or oil/water interfaces, reducing surface and interfacial tensions between the fluid phases and thus making some compounds more miscible. They present high cost of production, consequence of the value of the substrate and the purification methods used in the industrial process. The strategy of replacing conventional substrates for their production (such as glucose and sucrose) by substrates from renewable sources, cheaper and rich in nutrients for the culture of microorganisms producing biosurfactants is essential to enable their production on an industrial scale. Thus, two processes were carried out to produce biosurfactants: medium containing sucrose (conventional), and the other the aqueous extract obtained from the algaroba pods [*Prosopis juliflora* (SW) DC] as a substrate for the development of *Bacillus subtilis*. The cultures were monitored for 96 hours and the biosurfactant production was characterized by emulsification, purification (centrifugation, acid precipitation and liquid-liquid extraction) tests and determination of their antimicrobial activity. The acid precipitation and liquid-liquid extraction methods recovered a biosurfactant production of 0.064g/L and 1.208g/L, respectively, sucrose and aqueous extract of the algaroba. In addition, the biosurfactants produced showed good emulsifying capacity when placed in contact with three different hydrophobic compounds (vegetable oil, motor oil and kerosene) and antimicrobial activity with respect to the microorganisms *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* and *Pseudomonas* sp.

**KEYWORDS:** Emulsifiers, surfactin, antimicrobial activity and bioreactors.

## 1 | INTRODUÇÃO

Biossurfactantes são moléculas anfipáticas, constituídas de uma porção hidrofílica e uma porção hidrofóbica, sintetizadas por microrganismos que agem nas interfaces água/óleo ou óleo/água reduzindo as tensões superficiais e interfaciais entre elas e assim tornando alguns compostos mais miscíveis (BANAT *et al.*, 2010). A porção apolar é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada enquanto a polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica. Essa constituição molecular confere a capacidade de diminuir a tensão superficial entre fases fluidas, como água e óleo ou ar e água (DESAI e BANAT, 1997).

A formação de um filme molecular, ordenado nas interfaces, reduz a tensão interfacial e superficial, sendo responsável pelas propriedades únicas dos surfactantes, como a capacidade de adsorção, formação de micelas, formação de macro e microemulsões, lubrificação, ação espumante, solubilização e detergência. Devido essa propriedade, várias são as aplicações industriais que envolvem o uso de biossurfactantes, como indústria de petróleo no processo de recuperação melhorada de petróleo (MEOR) (BANAT *et al.*, 2000; SEN, 2008); farmacêutica e de cosméticos como a capacidade de formar emulsões estáveis associada à boa compatibilidade com

pele e cabelos; na agricultura para a formulação de herbicidas e pesticidas (COSTA, 2005); na produção de produtos de higiene pessoal, detergentes, processamento de alimentos como agentes emulsionantes conferindo a consistência e textura dos alimentos (BANAT *et al.*, 2000); tratamento e processamento de metais, vestuário, processamento de polpas de papel (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

A maioria dos surfactantes convencionais produzidos atualmente é derivada do petróleo e constituem compostos tóxicos e não biodegradáveis, fatores que justificam a busca por alternativas menos nocivas ao ambiente e ao homem, uma vez que existe a preocupação com os efeitos alérgicos dos produtos artificiais. Os biossurfactantes apresentam maior eficiência quando comparados aos surfactantes convencionais: menor concentração micelar crítica (CMC), biodegradabilidade, maior taxa de redução da tensão superficial, solubilidade em água alcalina, estabilidade térmica, estabilidade em valores extremos de pH, a baixa toxicidade dos biossurfactantes permite então seu uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (VIJAYAKUMAR e SARAVANAN, 2015).

Os biossurfactantes podem ser sintetizados a partir de substratos que contenham altos níveis de carboidratos ou de lipídeos, suprimindo a necessidade de fonte de carbono para sua produção (NITSCHKE; FERRAZ; PASTORE, 2004). Embora essas biomoléculas apresentem inúmeras vantagens sobre os surfactantes sintéticos os custos para sua produção ainda constituem um entrave para sua utilização em ampla escala. O desenvolvimento de processos que reduzam custos de matérias primas permitiria o sucesso da produção de biossurfactantes uma vez que estes são responsáveis por cerca de 30% de todo custo de produção (MAKKAR e CAMEOTRA, 2002). A fim de baratear sua produção, estratégias de utilizar substratos não convencionais, obtidos de fontes renováveis, são desejáveis.

A algaroba [*Prosopis juliflora* (SW) D.C.] é uma leguminosa arbórea, não oleaginosa, da família Fabaceae, originária das Américas, mais especificamente em Piúra no Peru, (encontrada desde a América do Norte a Central e Sul) e também na África Tropical. Chegou no Brasil há mais de 50 anos, estando difundida na região Nordeste, em populações cultivadas e subespontâneas (SILVA *et al.*, 2002). De acordo com Lima (1988), o interesse e a grande difusão desse gênero no semiárido nordestino pode ser atribuída as suas diversas características como: adaptar-se a solos e climas severos; rápida taxa de crescimento; alta palatabilidade como forragem; produtividade; capacidade de rebrotar e resistir a podas e ao pastejo; e resistência a pragas e doenças. Além de sua rusticidade e por frutificar na época mais seca do ano, sendo a única fonte alimentar economicamente viável que permite a sobrevivência da criação de bovinos e caprinos (SILVA *et al.*, 2003). Seu fruto é uma vagem rica em proteína, gordura, vitaminas, sais minerais e, principalmente, açúcar (BORGES, 2004), que normalmente no período de seca é utilizada como ração animal.

As vagens de algaroba, quando maduras, possuem elevado teor de sacarose e matéria seca de aproximadamente 84,0%. Silva *et al.* (2002) relataram que essa

produção comprova o potencial dessas vagens como aditivos em silagens de capim. Os mesmos autores, reportaram ainda grande aceitabilidade da algaroba, por possuir teores de 25 a 28% de glicose, 11 a 17% de proteínas e 14 a 20% de ácidos orgânicos, pectinas entre outras substâncias. O resíduo da algaroba é classificado com concentrado energético, pois possui alto teor de sacarose, e é bastante aceito na suplementação alimentar dos animais pelo seu aroma agradável (MAGALHÃES, 2007). Carvalho *et al.* (2006) estudaram as opções de alimentos alternativos de maior valor nutritivo e que possam vir futuramente como alternativa na substituição de alimentos de alto custo financeiro, como o milho e a soja. Portanto, mostrando-se ter um potencial alimentício de mais baixo custo.

Neste contexto, para o processo de produção de biossurfactantes foi utilizado o extrato aquoso obtido das vagens da algaroba, como fonte de carbono não convencional, para o desenvolvimento *Bacillus subtilis* UFPEDA 16, linhagem produtora de biossurfactantes como subtilisina e surfactina.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado no processo de produção de biossurfactantes foi a linhagem *Bacillus subtilis* (UFPEDA 16) cedido da Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

### 2.2 Manutenção das linhagens

As culturas foram mantidas em meio Ágar Nutriente. A renovação das células foi realizada mensalmente por repiques e incubação a 30°C durante 24 horas e depois armazenadas a 4°C.

### 2.3 Substrato

No processo de produção de biossurfactantes foi utilizado o extrato aquoso obtido da prensagem das vagens da algaroba. As vagens da algaroba foram coletadas da região semiárida do Rio Grande do Norte, especificamente na zona rural do município de Japi – RN.

O extrato aquoso da algaroba foi obtido com base na metodologia descrita por Silva *et al.* (2009), as vagens foram devidamente selecionadas, descartando as atacadas por fungos e insetos. Pesadas e sanitizadas por meio da imersão em uma solução de hipoclorito de sódio a 3%(v/v) durante 5 minutos. A remoção dos resíduos sanitizantes foi realizada por lavagens sucessivas em água corrente. Em seguida, foram hidratadas em água destilada aquecida a  $65 \pm 2^\circ\text{C}$ , na proporção de 1:1 (m/v) (1kg de vagem para 1L de água) durante 3 horas para melhor extração dos açúcares

disponíveis.

Para prensagem foi utilizada uma prensa hidráulica manual, em que a matéria-prima foi inserida em um cilindro de aço inoxidável perfurado e submetidas a uma pressão de 50Kgf/cm<sup>2</sup>.

## 2.4 Processo de produção de biossurfactantes

Foram realizados dois processos em cultivo submerso. O primeiro processo foi utilizado como fonte de carbono a sacarose (padrão), e o segundo foi utilizado o extrato aquoso da algaroba como fonte de carbono, ambos sendo desenvolvidos em biorreator de bancada de 4,5L (Tecnal).

1° Processo	2° Processo
20g/L de sacarose	1% (v/v) de extrato de algaroba
3,0g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
7,0g/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,0g/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0,2g/L MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2g/L MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
1,0g/L (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0g/L (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	1,0g/L de extrato de levedura

Tabela 1 – Composição dos meios utilizados no processo de produção de biossurfactantes em biorreator de bancada

\*Em ambos, o pH foi ajustado para 6,8.

Os inóculos foram preparados por meio da transferência, com alça de platina, de colônias isoladas crescidas em tubos inclinados com meio de manutenção Ágar Nutriente para frascos erlenmeyers de 250mL contendo 100mL de meio de cultura para o processo, obedecendo uma razão de aeração de 40%, e incubados a 37°C sob agitação de 200rpm em incubadora rotativa orbital (SL 422 - Solab). O crescimento microbiano foi acompanhado pela determinação da absorbância dos meios de cultivos a 600nm (D.O.600nm). Os inóculos foram adicionados ao cultivo, na proporção de 10% (v/v), quando a absorbância se encontrava entre 0,6 e 0,8 (HISS, 2001).

O cultivo com sacarose (substrato padrão) foi realizado em biorreator de bancada com as seguintes condições de processo: volume útil de 4,5L contendo 2L de meio de cultura, sob agitação de 150rpm, com uma vazão de 1L/min de ar esterilizado, a 37°C e pH controlado a 6,8. A espuma (alta concentração de biossurfactante) gerada durante o cultivo foi coletada por meio de um dispositivo acoplado no biorreator (Figura 1), a fim de ser utilizada nos testes de emulsificação e na determinação da atividade antimicrobiana.

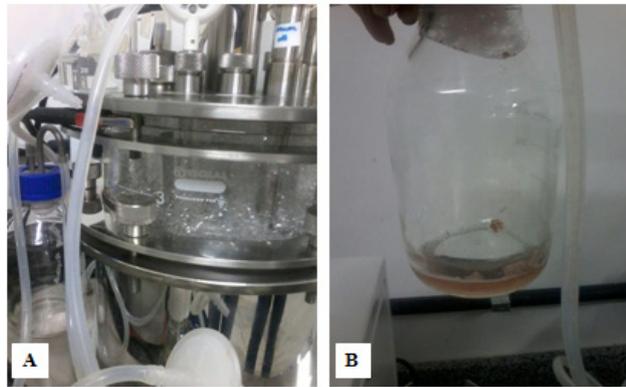


Figura 1 – Biorreator durante o processo de produção de biossurfactantes com sacarose como substrato, como é demonstrado em A. Em B, o frasco acoplado ao sistema para a coleta das espumas.

Fonte: autores, 2018

O cultivo com extrato aquoso da algaroba (substrato não convencional) foi realizado em biorreator nas mesmas condições citadas no processo com a sacarose (substrato padrão).

## 2.5 Análises dos processos fermentativos

Em tempos regulares, os cultivos foram analisados quanto à concentração de microrganismos, concentração de substrato e produção do biossurfactante por determinação do índice de emulsificação.

### 2.5.1 Concentração de microrganismo (biomassa)

O crescimento microbiano foi acompanhado pelo método gravimétrico. A determinação do peso seco consistia em adicionar 2mL de caldo fermentado ao microtubo de massa conhecida, centrifugar (10000 rpm por 10 minutos, MiniSpin Plus) e, após centrifugação, o sobrenadante era descartado.

A fração sólida sedimentada foi pesada e colocada em estufa a 80 °C por 24h. Em seguida, a fração sólida livre de umidade foi pesada. O procedimento foi realizado em triplicata. O peso seco foi determinado de acordo com a Equação 1.

$$\text{Peso seco} \left( \frac{g}{mL} \right) = \frac{(\text{peso do microtubo com massa seca}) - (\text{peso do microtubo})}{\text{volume da amostra}} \quad (1)$$

### 2.5.2 Quantificação do substrato

A quantificação de substrato foi realizada pela análise do sobrenadante (caldo fermentado isento de células). Para determinação dos açúcares redutores totais utilizou-se o método DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico) descrito por Miller (1959) e adaptada

por Santos (2007). A concentração dos açúcares redutores totais foi determinada após hidrólise da amostra, uma vez que o extrato de algaroba é rico em sacarose. A curva padrão de glicose (1g/L) foi utilizada para quantificação dos açúcares redutores presentes na amostra. Cada amostra foi analisada em triplicata.

### 2.5.3 Quantificação do biossurfactante

A produção de biossurfactante foi determinada pelo índice de emulsificação ( $IE_{24}$ ) com base na metodologia descrita por Cooper e Goldenberg (1987). Em três colunas graduadas, adicionou-se três tipos de compostos hidrofóbicos (óleo de motor, óleo vegetal e querosene) e o sobrenadante do cultivo na proporção (3:2). Todos os tubos foram agitados em vórtex durante 2 minutos e deixados em repouso durante 24 horas. A porcentagem de emulsificação foi determinada pela Equação 2:

$$IE_{24} (\%) = \frac{\text{altura da camada emulsificada}}{\text{altura total}} \times 100 \quad (2)$$

## 2.6 Processo de purificação de biossurfactantes

### 2.6.1 Acidificação do sobrenadante

Os sobrenadantes de ambos os processos foram acidificados com ácido clorídrico a 3,0 M até atingir o pH 2,0. Após, foram mantidos a 4°C por 24 horas para precipitação do biossurfactante produzido. Os precipitados foram separados por centrifugação a 15000rpm por 10 min (MiniSpin plus, Eppendorf). Todo precipitado foi dissolvido em 10mL de água deionizada (pH 8,0).

### 2.6.2 Processo de extração líquido-líquido

Extração do biossurfactante obtido no processo com sacarose: a solução resultante da acidificação foi transferida para um funil de separação e submetida à extração com diclorometano (1:1). Agitou-se, vigorosamente, por 5 minutos. Seguido por 1 hora de repouso para atingir a completa separação de fases. A fase mais densa foi retirada do funil. Adicionou-se 2mL de metanol, a fim de transferir o produto para o microtubo. O metanol foi evaporado. E o produto foi ressuspenso em 1mL de água deionizada.

Extração do biossurfactante obtido no processo com extrato aquoso da algaroba: a solução resultante foi transferida para um funil de separação e submetida à extração com diclorometano (1:1). Agitou-se, vigorosamente, por 5 minutos. Seguido por 1 hora de repouso para que a completa separação de fase. A fase mais densa foi retirada do funil. Em seguida, foi realizada uma nova extração com diclorometano, clorofórmio e

metanol (1:1:1:1). Agitou-se por 5 minutos. Repouso por 1 hora. Novamente, a fase mais densa foi retirada e submetida a uma nova extração com clorofórmio e metanol (1:1:1). Agitou-se por 5 minutos e repouso por 1 hora. A fase resultante foi transferida para um microtubo e centrifugada a 14.000g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado. Após evaporação dos solventes, o produto foi ressuspensão em 1,0mL de água deionizada.

## 2.7 Determinação da atividade antimicrobiana

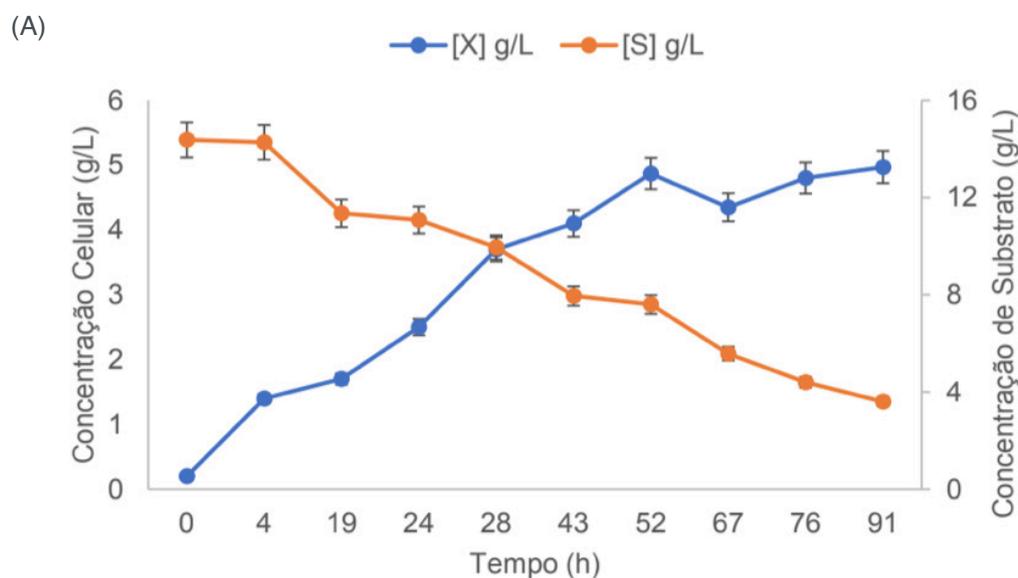
Para avaliação da atividade antimicrobiana foi utilizado os seguintes microrganismos: *Bacillus pumilus*, isolado do solo cultivado da cana-de-açúcar da região de Santa Rita/PB, *Pseudomonas sp.* cedido pelo Laboratório de Microbiologia Ambiental do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba e *Bacillus sp.* cedido pelo Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba.

As linhagens foram repicadas em placas de Petri com 10mL de meio de manutenção e incubadas por 24 horas a 37°C. Em seguida, foi adicionado 100µL do biossurfactante em discos de papel de filtro com diâmetro de 2,7cm e, após as placas foram deixadas em repouso por mais 24 horas.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Produção de biossurfactantes

As curvas mostradas na Figura 2A e 2B descrevem o crescimento celular, o consumo de substrato durante o processo de produção de biossurfactantes utilizando os substratos sacarose e extrato aquoso de algaroba, respectivamente.



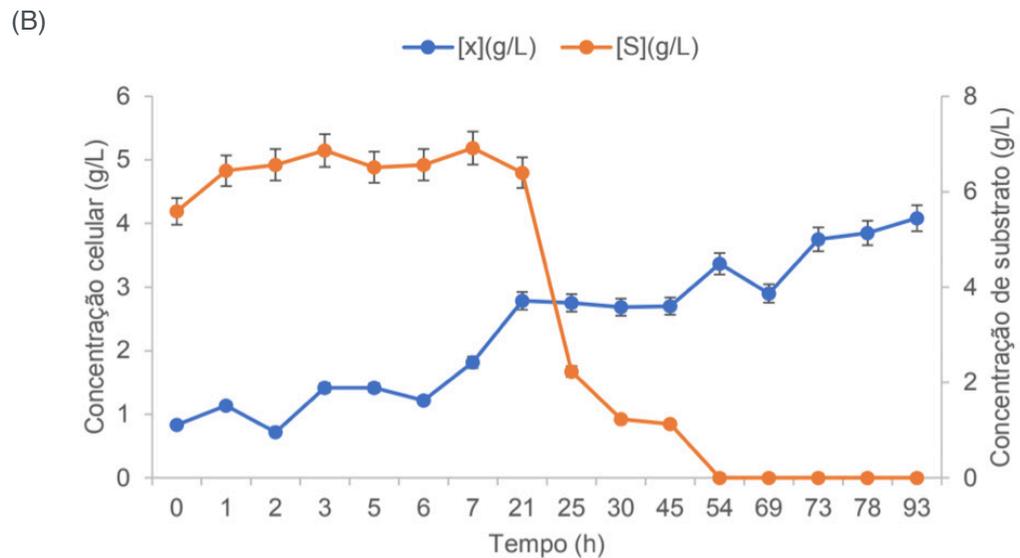


Figura 2 – Curvas de crescimento celular e consumo de substrato durante o processo de produção de biossurfactantes

Pela análise das curvas de crescimento microbiano, verifica-se que a linhagem *Bacillus subtilis* UFPEDA 16 adaptou-se ao sistema de cultivo proporcionado para ambos os substratos. A fase exponencial de crescimento foi observada de 0 a 52 horas de processo para o substrato sacarose e de 2 a 21 horas para o extrato aquoso da algaroba, e a fase de estacionária foi estabelecida após esses períodos. Embora normalmente cultivado em meio contendo sacarose como principal fonte de carbono, a análise demonstra que a linhagem microbiana tem habilidade para se desenvolver em outro substrato mais complexo.

No meio com sacarose, observa-se um rápido crescimento e maior duração da fase exponencial durante o cultivo. A concentração celular máxima obtida foi de 4,75 g.L<sup>-1</sup> e um consumo de sacarose de 6,78 g.L<sup>-1</sup> em 52 horas.

Segundo Desai e Banat (1997), o estudo cinético relata muitas variações na produção de biossurfactantes. Em casos específicos, a maior produção é observada nas condições limitantes do crescimento, pela limitação do nitrogênio entre outros fatores. Alguns autores defendem a teoria de que os biossurfactantes apresentam maiores concentrações no final da fase estacionária e início da estacionária. Besson e Michel (1992) afirmaram que em *B. subtilis*, o biossurfactante surfactina, já é produzida na fase exponencial de crescimento, ainda que em pequenas concentrações. O produto formado pode estar ou não associado ao crescimento celular, pois dependerá de diversos fatores inclusos, como: o microrganismo proposto como agente transformador ou até mesmo, o meio de cultivo a ser utilizado no processo (DEBON, 2015).

Como forma de identificar a presença de biossurfactante no processo, foi determinado o índice de emulsificação dos sobrenadantes obtidos em cada um dos cultivos analisados. As análises de índice de emulsificação estão ilustradas na Figura 3.

Ao observar a Figura 3, constata-se que os índices de emulsificação foram

similares, apresentando um índice médio de 54% de emulsão.

As análises realizadas com o querosene apresentaram emulsificação apenas com a espuma e com o sobrenadante do cultivo com sacarose, provavelmente pela característica do processo ter um meio de cultura apenas com reagentes sintéticos, uma vez que o biossurfactante produzido presente na espuma não possui alta concentração de metabólitos oriundos do cultivo.

Os melhores resultados foram obtidos quando os sobrenadantes dos cultivos com sacarose e extrato aquoso da algaroba foram analisados com o óleo de motor. Nestes, a emulsão apresentou maior índice de emulsificação e demonstrou-se bastante estável durante a análise. Porém, a emulsificação com a espuma apresentou um índice menor, mas mantendo-se estável durante o processo.

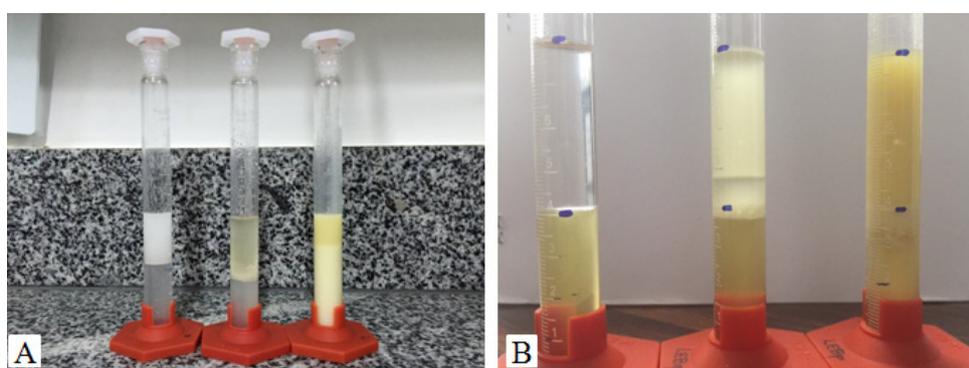


Figura 3 – Testes de emulsificação realizados com os sobrenadantes: (A) emulsificação com o biossurfactante produzido a partir da sacarose (convencional) e (B) emulsificação com o biossurfactante produzido a partir do extrato aquoso da algaroba (não convencional). \*compostos hidrofóbicos da esquerda para direita: querosene, óleo vegetal e óleo de motor

Os índices de emulsificação determinados podem ser acompanhados na Tabela 2:

Teste de emulsificação	1º cultivo		2ºcultivo
	Espuma	Sobrenadante	Sobrenadante
Óleo vegetal	60%	48%	53%
Querosene	40%	45%	0,1%
Óleo de motor	20%	98%	62%

Tabela 2 – Índices de emulsificação representados em porcentagem. No primeiro cultivo foram realizados dois testes, um com a espuma que foi coletada durante o processo fermentativo e outro com o sobrenadante do cultivo de 90 horas. No segundo cultivo o teste foi realizado apenas com o sobrenadante do processo fermentativo de 160 horas.

De acordo com alguns pesquisadores, para que a emulsão seja considerada eficaz, o índice de emulsificação deve ser superior a 40% (YOUSSEF *et al.*, 2004). Logo, desta forma o presente estudo apresentou resultados satisfatórios, quando considerado o composto com características lipofílicas.

### 3.2 Processo de purificação do biossurfactante

A característica do biossurfactante no ponto de vista estrutural permite a sua solubilização em meio alcalino e precipitação em meio ácido. Baseado nessa característica molecular, o sobrenadante do cultivo, em ambos substratos utilizados, foi submetido à precipitação ácida como uma das etapas de recuperação e purificação do biossurfactante produzido.

O processo de purificação do biossurfactante para o cultivo com sacarose apresentou um rendimento da extração igual a 0,064g/L de surfactina. Já a análise da extração do biossurfactante produzido em meio contendo o extrato aquoso da algaroba apresentou um rendimento de 1,208g/L.

Os biossurfactantes produzidos a partir do extrato aquoso de algaroba e sacarose obtiveram comportamentos distintos com relação às análises de caracterização. Para recuperação do biossurfactante produzido a partir da sacarose foi utilizado um processo de extração líquido-líquido somente com o diclorometano, uma vez que a surfactina (biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis*) tem maior caráter lipossolúvel devido a sua estrutura molecular. Essa recuperação foi bastante eficiente permitindo a separação do biossurfactante do sistema aquoso do caldo obtido do processo fermentativo.

O processo de extração do biossurfactante produzido a partir do extrato aquoso de algaroba utilizando somente o diclorometano não se apresentou tão eficiente quanto à extração do cultivo com sacarose. Embora tenha observado uma concentração maior no final dessa extração, não se pode afirmar que a extração foi mais eficiente, pois mesmo após o processo de extração, o líquido resultante ainda apresentava alguns resíduos do substrato utilizado, o que pode ter interferido no peso da amostra final. A partir dessa observação, o precipitado formado além de conter a surfactina produzida pelo *Bacillus subtilis*, pode conter ainda outros componentes do próprio extrato aquoso da algaroba, como o polímero galactomana inerente a composição da algaroba, tornando-se a separação mais difícil de ocorrer.

### 3.3 Determinação da atividade antimicrobiana

Os biossurfactantes purificados e a espuma demonstraram ter atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *B. subtilis*, *B. pumilus* e *Pseudomonas* sp.

Na Tabela 3, pode-se analisar os diâmetros dos halos formados pela atividade antimicrobiana proporcionada pelos sobrenadantes e a espuma gerados nos processos de produção de biossurfactantes.

Amostra	Microrganismo alvo e tamanho do halo formado (mm)		
	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus pumillus</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.
Controle	0,00	0,00	0,00
Biossurfactante (meio sacarose)	0,00	90,0	0,00
Biossurfactante (meio algaroba)	70,0	90,0	10,0
Espuma	125,0	130,0	150,0

Tabela 3 – Resultados da atividade antimicrobiana frente aos microrganismos analisados.

Os biossurfactantes do tipo surfactina têm características terapêuticas, principalmente atividades antimicrobianas, tais análises demonstraram, por meio da formação de halo na placa de cultivo, bastante eficiência com relação à atividade antibiótica frente aos microrganismos analisados. A atividade antimicrobiana foi quantificada, o biossurfactante presente na espuma apresentou a maior atividade microbiana tendo como resultado um halo de 125, 130 e 150mm, respectivamente, no *Bacillus* sp, no *Bacillus pumillus* e *Pseudomonas* sp.

#### 4 | CONCLUSÃO

A utilização do extrato aquoso da algaroba pode ser considerada uma ótima fonte renovável de substrato no cultivo de *B. subtilis* (UFPEDA 16) para produção de biossurfactantes. A atividade emulsificante apresentada (62%) e o poder antimicrobiano são considerados bons resultados para produção da surfactina a partir de um substrato em abundância no nordeste brasileiro. Os métodos de extração do biossurfactante foram eficientes, pois sua recuperação foi obtida com menos etapas possíveis de purificação e atingindo boa reprodutibilidade nas análises de emulsificação e atividade antimicrobiana.

#### REFERÊNCIAS

- BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. **Potential comercial applications of microbial surfactants**. Applied Microbiology and Biotechnology. V.53, p.495-508, 2000.
- BANAT, I.M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M.G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T.J.; MARCHANT, R. **Microbial biosurfactants production, applications**. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 87, n. 2, p. 427-444, 2010.
- BESSON, F.; MICHEL, G. **Biosynthesis of iturin and surfactin by Bacillus subtilis: Evidence for aminoacid activating enzymes**. Biotechnology Letters, v.14. 1013-1018, 1992.
- BORGES, I. F., **Obtenção e Caracterização do Melado de Algaroba (Prosopis juliflora) e sua Utilização em uma formulação Alimentícia**. 2004. 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2004.

- CARVALHO, G.G.P. **Capim-Elefante emurchecido ou com farelo de cacau na produção de silagem**. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 69 p, 2006.
- COOPER, D.G.; GOLDENBERG, B.G. **Surface-active agents from two *Bacillus* species**. Applied and Environmental Microbiology, v. 53, n.2, p.224-229, 1987.
- COSTA, G.A.N. **Produção biotecnológica de surfactantes de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações**. 2005. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- DEBON, J. **Produção de biosurfactante por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em condição anaeróbia**. 2015. 165f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Programa de pós-graduação em Engenharia química, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2015.
- DESAI, J.D.; BANAT, I. M. **Microbial production of surfactants and their commercial potential**. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 61, p. 47-64, 1997.
- HISS, H. **Cinética de processos fermentativos**. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.R. (Coord.) Biotecnologia Industrial. São Paulo: Edgard Blucher, p.93-122, 2001.
- LIMA, P. C. F. ***P. Juliflora* mangement at the Brazilian Northeast. In: The current state of knowledge on *Prosopis juliflora***. International Conference on Prosopis. Rome. Anais. Rome: FAO, p.153-162. 1988.
- MAGALHÃES, K.A. **Tabelas brasileiras de composição de alimentos, determinação e estimativa do valor energético de alimentos para bovinos**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 263 p., 2007.
- MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. **An update to the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications**. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 58, p. 428-434, 2002.
- MILLER, G.L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar**. Analytical Chemistry, v. 31, p.426, 1959.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. **Biosurfactantes: propriedades e aplicações**. Química nova, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.
- NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G.M. **Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes**. Braz. J. Microbiol., v. 35, n. 1-2, p. 81-85, 2004.
- OLIVEIRA, D. **Produção de biosurfactante por *Bacillus subtilis* LAMI005 utilizando suco de caju clarificado**. 2010. 103 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2010.
- SEN, R. **Biotechnology in petroleum recovery: the microbial EOR**. Progress in Energy and Combustion Science, v.34, p.714-724, 2008.
- SILVA, J. H. V.; OLIVEIRA, J. N. C.; SILVA, E. L.; et al. **Uso da farinha integral de vagem de algaroba (*Prosopis juliflora* (sw) D.C.) na alimentação de codornas japonesas**. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 31, n.3, p. 1789-1795, 2002
- VIJAYAKUMAR, S.; SARAVANAN, V. **Biosurfactants-types, sources and applications**. Res. J. Microbiol., v. 10, p. 181–192, 2015.

## SUPLEMENTAÇÃO COM DIFERENTES NUTRACÊUTICOS ATENUA PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS CARACTERÍSTICOS DO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

### Ana Olívia Martins Laurentino

Universidade Federal do Rio Grande do Sul –  
UFRGS

Porto alegre – RS

### Naiana da Rosa

Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL  
Tubarão – SC

### Tamires Mateus Gomes

Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL  
Tubarão – SC

### Eduardo de Medeiros Peretti

Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL  
Tubarão – SC

### Fabiana Durante de Medeiros

Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL  
Tubarão – SC

### Jucélia Jeremias Fortunato

Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL  
Tubarão – SC

**RESUMO:** Torna-se interessante avaliar os efeitos da suplementação de ômega-3 ( $\omega$ -3) e ácido fólico em um modelo animal de autismo devido à complexidade dos seus sintomas e da gama de efeitos colaterais causados pelos fármacos utilizados no seu tratamento. Para este estudo foram utilizadas 20 fêmeas de ratos Wistar prenhes. No dia gestacional (DG) 9.5 os animais receberam 100  $\mu$ g/Kg de LPS

ou solução salina. A prole permaneceu com as mães até o desmame e no dia pós-natal (PND) 22 receberam por via oral  $\omega$ -3, ácido fólico, risperidona ou salina em doses específicas. No PND 30 e 60 realizaram-se os testes de estereotipia e interação social e no PND 45 o teste de memória social. Os resultados demonstraram que a suplementação com os nutracêuticos mostrou-se positivamente efetiva sobre parâmetros comportamentais, especialmente a suplementação de ácido fólico, sugerindo que estes nutracêuticos podem servir futuramente como uma alternativa terapêutica não convencional para o tratamento do TEA.

**PALAVRAS-CHAVE:** Transtorno do Espectro Autista, Nutracêuticos, Ácido fólico.

**ABSTRACT:** It is interesting to evaluate the effects of omega-3 ( $\omega$ -3) and folic acid supplementation in an animal model of autism due to the complexity of its symptoms and the range of side effects caused by the drugs used in its treatment. For this study Twenty pregnant females Wistar rats were used. On gestational day (DG) 9.5 the animals received 100  $\mu$ g/kg of LPS or saline solution. The offspring remained with the mothers until weaning and on the postnatal day (PND) 22 received orally  $\omega$ -3, folic acid, risperidone or saline in specific doses. In PND 30 and 60 was performed the stereotypy and social interaction tests and in

the PND 45 the social memory test. The results showed that supplementation with nutraceuticals was positively effective on behavioral parameters, especially folic acid supplementation, suggesting that these nutraceuticals may serve in the future as a non-conventional therapeutic alternative for the treatment of ASD.

**KEYWORDS:** Autism spectrum disorder, Nutraceuticals, Folic acid.

## 1 | INTRODUÇÃO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é caracterizado como um transtorno multifatorial que causa prejuízos nas áreas pertinentes ao comportamento e interesses, interação social e comunicação. Acredita-se que infecções bacterianas ou virais durante o período gestacional podem causar alterações nas respostas imunes maternas e desencadear o desenvolvimento do TEA, porém, sua etiologia ainda não foi bem elucidada (FORTUNATO et al., 2017).

Devido à complexidade patológica do TEA, os tratamentos indicados para o autismo, como o uso de Risperidona, costumam causar diversos efeitos colaterais e prejudicar a qualidade de vida dos indivíduos autistas (LAI et al., 2014). Desta forma, a utilização de nutracêuticos, termo que refere-se um alimento ou parte de um alimento que fornece benefícios à saúde, vem surgindo como uma alternativa terapêutica não tradicional objetivando atenuar os sintomas característicos de transtornos complexos como o TEA (REHMAN et al., 2018; SARRIS et al., 2016).

Considerando os estudos recentes sobre a relação entre alterações nos mecanismos pró-inflamatórios juntamente com o estresse oxidativo e o desenvolvimento do TEA, propomos investigar os efeitos da intervenção nutricional com ômega-3 e ácido fólico sobre parâmetros comportamentais através de um modelo pré-clínico da doença, pois, sugerimos que esta intervenção possa criar um modelo de integração bem sucedida, melhorando a capacidade antioxidante e atenuando o estímulo pró-inflamatório, com diminuição tanto do processo inflamatório quanto do dano decorrente deste.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade do Sul de Santa Catarina sob o protocolo 16.015.4.01.IV. Para tal, foram utilizadas 20 ratas fêmeas *Wistar* prenhes, pesando entre 250 e 300g, que foram acasaladas com 10 machos da mesma linhagem e peso. Durante todo o experimento, os animais permaneceram em padrão sanitário e em temperatura controlados ( $22^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), com períodos de luz artificial (12 horas claro/escuro) e receberam ração comercial padronizada e água *ad libitum*.

Para a caracterização do modelo animal de autismo a partir da ativação imune materna descrita por Kirsten et al. (2010), as matrizes foram divididas aleatoriamente

em dois grupos. Um dos grupos recebeu a administração intraperitoneal (ip) de uma única injeção de lipopolissacarídeo (LPS) extraído da bactéria *E. coli* (Sigma-Aldrich Co.®), na dose de 100 µg/Kg no 9.5º dia gestacional (DG), caracterizando o grupo experimental (LPS-tratados) (KIRSTEN et al., 2010). O segundo grupo recebeu apenas solução NaCl 0,9% estéril via ip no volume equivalente ao grupo experimental, caracterizando o grupo controle (Salina-tratados). A prole de cada um dos grupos experimentais foi subdividida em outros 4 grupos no dia pós natal (DPN) 21, período em que é feito o desmame, de acordo com o tratamento recebido:

Grupo Salina + Salina (n=10)	Grupo LPS + Salina (n=10)
Grupo Salina + Risperidona (n=10)	Grupo LPS + Risperidona (n=10)
Grupo Salina + AGP ω-3 (n=10)	Grupo LPS + AGP ω-3 (n=10)
Grupo Salina + Ác. fólico (n=10)	Grupo LPS + Ác. fólico (n=10)

O AGP ω-3 foi administrado na dose de 0,8 g/kg, via oral, durante 21 dias consecutivos e a solução salina foi administrada no mesmo volume, na mesma via e durante o mesmo período de tempo conforme descrito por FORTUNATO et al. (2017). A risperidona (grupo controle-positivo) foi diluída em solução salina e administrada na dose de 1,0 mg/kg, via oral por 21 dias consecutivos, configurando o grupo controle positivo. O ácido fólico foi administrado na dose de 50mg/kg durante 7 dias consecutivos por via oral. Todas as administrações iniciaram no DPN 22. No DPN 30 e DPN 60 foram realizados os testes de interação social e estereotipia de acordo com o proposto por Schneider e Prezewlocki (2005) e no DPN 45 foi realizado o teste de memória social conforme a metodologia de Barichello et al. (2007).

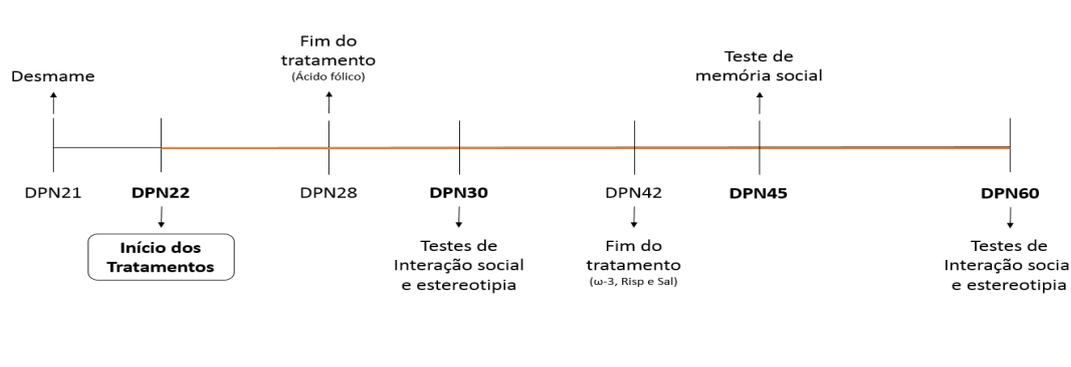


Figura 1 – Delineamento experimental dos períodos de tratamento e dos testes comportamentais.

Fonte: Elaboração dos autores, 2018.

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa *GraphPad Prism v. 5* e os dados paramétricos foram avaliados por análise de variância de uma via (ANOVA) e os grupos foram comparados entre si através do *post-hoc* de Tukey. A significância estatística foi considerada para valores de  $p < 0,05$  e todos os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso dos nutracêuticos na prevenção de doenças ou promoção da saúde é uma tendência emergente e bastante promissora, pois, eles possuem a capacidade de alterar funções metabólicas e fisiológicas. Do mesmo modo, autores afirmam que suplementações com nutracêuticos têm sido utilizadas no tratamento de doenças neurológicas e neuroinflamatórias, como: doença de Alzheimer (AD), doença de Parkinson (DP) e autismo (PANDAREESH et al., 2018; MOORE et al., 2010; JAEGER et al., 2017).

Dentre os nutracêuticos mais utilizados destacam-se o ácido fólico e o ômega-3. O ácido fólico é comumente utilizado por gestantes para prevenir alterações na formação do tubo neural. Contudo, muito tem se discutido se estes efeitos também podem ser estendidos para as alterações neurocomportamentais como as encontradas no TEA. Uma revisão realizada por Gao et al. (2016), mostrou que existem fortes evidências de que a suplementação com ácido fólico possa causar efeitos benéficos no neurodesenvolvimento e diminuir as características comportamentais típicas do TEA.

Da mesma forma, um estudo experimental realizado por Fortunato et al. (2017) mostrou que a suplementação com o ácido graxo poli-insaturado ômega-3 foi capaz de reverter parâmetros comportamentais e bioquímicos associados a um modelo de TEA induzido pela ativação imune materna.

Os nutracêuticos, de maneira geral, exercem um papel fundamental na regulação do metabolismo energético e das vias de sinalização que agem modulando a neurotransmissão e a neuroinflamação, além de estimular a atividade de fatores neurotróficos envolvidos na neuroplasticidade e na prevenção de doenças neurodegenerativas (PANDAREESH et al., 2018; MAZZIO et al., 2011).

Segundo Fortunato et al. (2017), apesar de a etiologia do TEA ainda ser desconhecida, suspeita-se que a neuroinflamação possa estar envolvida na sua fisiopatologia. Kirsten et al., (2010) postularam que a administração de LPS no 9,5<sup>o</sup> DG de ratas é capaz de causar alterações comportamentais compatíveis com o TEA na prole e que isto seja decorrente da ativação imune materna.

Os resultados dos testes de estereotipia (PND 30 e PND 60) mostraram que o grupo LPS + Salina apresentou um aumento significativo na frequência de movimentos estereotipados quando comparado com o grupo Salina + Salina, corroborando com o modelo da doença proposto por Kirsten et al. (2010).

Quanto aos tratamentos, pode-se verificar que os animais tratados com Risperidona e Ácido Fólico de ambos os grupos apresentaram frequência de *grooming* significativamente menor quando comparados com os grupos Salina + Salina e LPS + Salina, sugerindo uma melhora do comportamento estereotipado. Ainda foi possível verificar que os tratamentos com Risperidona e Ácido Fólico foram significativamente mais efetivos no grupo LPS quando comparados com o tratamento Ômega-3 (Gráfico

1A e 1B).

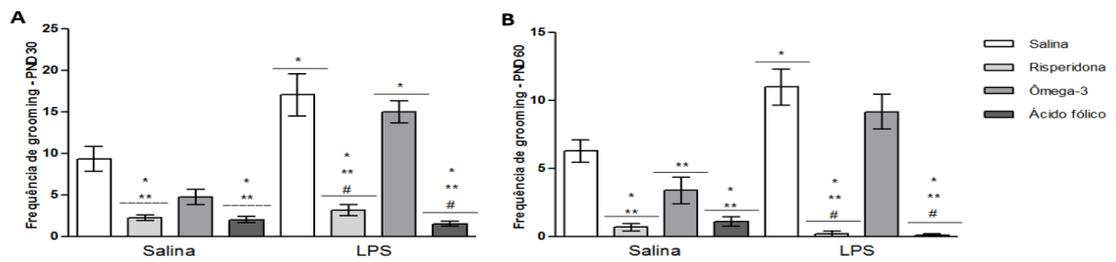


Gráfico 1 – Frequência de *grooming* no PND 30 (Figura 1A) e no PND 60 (Figura 1B) dos grupos: Sal + Sal, Sal + Risperidona, Sal + Ômega-3, Sal + Ácido fólico, LPS + Sal, LPS + Risperidona, LPS + Ômega-3, LPS + Ácido fólico. \*dados significativos quando comparados com o grupo Sal + Sal; \*\*dados significativos quando comparados com o grupo LPS + Sal; # dados significativos quando comparados com o grupo LPS + Ácido fólico.

Fonte: Elaboração dos autores, 2018.

Os resultados dos testes de interação social não mostraram diferenças significativas. Já os resultados do teste de memória social apresentaram significância em dois parâmetros: seguir e passar por cima. No parâmetro de seguir houve uma diminuição significativa entre os grupos Salina + Risperidona e LPS + Ácido Fólico quando comparados com o grupo LPS + Salina (Gráfico 2A).

O grupo LPS suplementado com Ácido Fólico apresentou diminuição significativa no parâmetro de passar por cima quando comparado com o grupo LPS + Salina e em ambos os parâmetros o grupo LPS + Ômega-3 apresentou uma tendência à diminuição, porém não significativa (Gráfico 2B). Estes dados permitem sugerir que a suplementação foi capaz de reverter os danos na memória de reconhecimento social causados pela exposição pré-natal ao LPS.

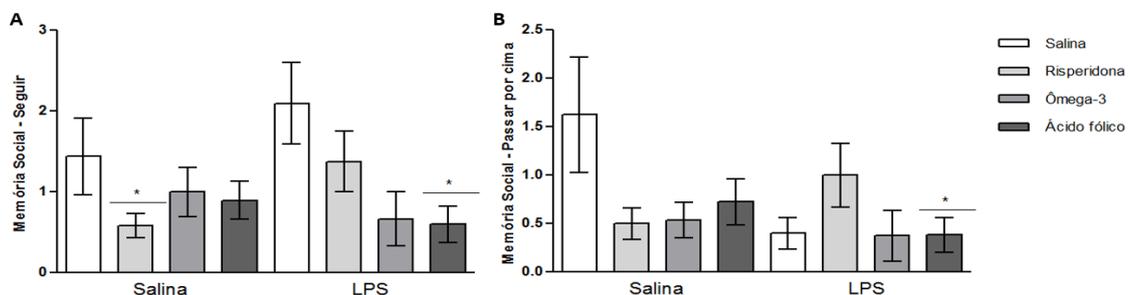


Gráfico 2 – Frequência de seguir (Figura 1A) e de passar por cima (Figura 1B) do teste de memória social dos grupos: Sal + Sal, Sal + Risperidona, Sal + Ômega-3, Sal + Ácido fólico, LPS + Sal, LPS + Risperidona, LPS + Ômega-3, LPS + Ácido fólico. \* dados significativos quando comparados com o grupo LPS + Sal.

Fonte: Elaboração dos autores, 2018.

A suplementação tem se mostrado eficaz para a prevenção ou melhora dos sintomas de doenças neurodegenerativas que estão associadas ao estresse oxidativo e à neuroinflamação por desempenharem um papel importante no desenvolvimento cognitivo normal (PANDAREESH et al., 2018).

Segundo os resultados dos testes, a suplementação com ácido fólico foi mais expressiva e, de acordo com a literatura, está intimamente relacionada com a diminuição de defeitos congênitos relacionados ao tubo neural e pode auxiliar na diminuição do surgimento de desordens neurobiológicas do desenvolvimento (GAO et al., 2016). Além disso, Santos & Pereira (2007) sugerem que a suplementação pós-natal deste nutracêutico pode reduzir as manifestações clínicas de indivíduos já afetados por doenças neurológicas, corroborando, assim, com os dados deste trabalho.

Considerando os dados encontrados neste estudo, sugerimos que uma intervenção nutricional com diferentes nutracêuticos, como o ômega-3 e ácido fólico, pode vir a ser uma alternativa terapêutica eficaz na diminuição das manifestações clínicas encontradas no TEA, sendo capaz de melhorar a capacidade antioxidante e atenuar o estímulo pró-inflamatório com diminuição tanto do processo inflamatório quanto do dano decorrente deste. O reconhecimento dos benefícios dos nutracêuticos no TEA pode mudar a forma como a doença é conceituada e as futuras decisões acerca do arsenal terapêutico, impactando positivamente na qualidade de vida dos pacientes autistas, familiares e cuidadores.

#### **4 | CONCLUSÕES**

A suplementação com nutracêuticos, em especial a com ácido fólico, foi capaz de atenuar os parâmetros comportamentais característicos do TEA. Acredita-se que tais fatos tenham sido decorrentes das ações neuroprotetoras destas substâncias e que estes nutracêuticos possam vir a ser utilizados como possíveis alternativas à utilização dos fármacos convencionais. Contudo, é necessário que sejam realizados mais estudos para verificar a efetividade destas substâncias em estudos clínicos. O conhecimento dos efeitos positivos destes nutracêuticos para pacientes autistas traz benefícios não só para os sujeitos afetados, como também para a família e os profissionais envolvidos com o tratamento destes.

#### **5 | FOMENTO**

O trabalho teve a concessão de Bolsa pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## REFERÊNCIAS

American Psychiatric Association. **Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V)**. 5 ed. Artes Médicas. Porto Alegre: 2013.

BARICHELLO, Tatiana et al. **Behavioral deficits in sepsis-surviving rats induced by cecal ligation and perforation**. Brazilian journal of medical and biological research, v. 40, n. 6, p. 831-837, 2007.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **Prevalence of autism spectrum disorders—autism and developmental disabilities monitoring network, 14 sites, United States, 2008**. MMWR. Surveill. Summ. 2012; 61(3):1-19.

EL-ANSARY, Afaf; AL-AYADHI, Laila. **Relative abundance of short chain and polyunsaturated fatty acids in propionic acid-induced autistic features in rat pups as potential markers in autism**. Lipids in health and disease, v. 13, n. 1, p. 140, 2014.

GAO, Yunfei et al. **New perspective on impact of folic acid supplementation during pregnancy on neurodevelopment/autism in the offspring children—a systematic review**. PloS one, v. 11, n. 11, p. e0165626, 2016.

JAEGER, Baptiste N.; PARYLAK, Sarah L.; GAGE, Fred H. **Mechanisms of dietary flavonoid action in neuronal function and neuroinflammation**. Molecular aspects of medicine, 2017.

KIRSTEN, Thiago B. et al. **Prenatal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring**. Neuroimmunomodulation, v. 17, n. 4, p. 240-251, 2010.

MOORE, Amy H. et al. **Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: reconsidering the role of neuroinflammation**. Pharmaceuticals, v. 3, n. 6, p. 1812-1841, 2010.

PANDAREESH, M. D. et al. **Nutrition and Nutraceuticals in Neuroinflammatory and Brain Metabolic Stress: Implications for Neurodegenerative Disorders**. CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders), v. 17, n. 9, p. 680-688, 2018.

REHMAN, M. U. et al. **Neuroprotective Strategies for Neurological Disorders by Natural Products: An update**. Current neuropharmacology, 2018.

SANTOS, Leonor Maria Pacheco; PEREIRA, Michelle Zanon. **Efeito da fortificação com ácido fólico na redução dos defeitos do tubo neural**. Cadernos de Saúde Pública, v. 23, p. 17-24, 2007.

SARRIS, Jerome et al. **Adjunctive nutraceuticals for depression: a systematic review and meta-analyses**. American Journal of Psychiatry, v. 173, n. 6, p. 575-587, 2016.

SCHNEIDER, Tomasz; PRZEWŁOCKI, Ryszard. **Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism**. Neuropsychopharmacology, v. 30, n. 1, p. 80, 2005.

## USO DO EXTRATO DE *Ganoderma lucidum* NO CONTROLE DA MANCHA FOLIAR EM PLANTAS DE CEVADA PROTEGENDO O MEIO AMBIENTE

### **Ricardo Zanirato da Costa Fernandes**

Graduado em Biomedicina, Diretoria da Saúde, UNINOVE, São Paulo.

### **Lorena de Cássia Barboza Pires**

C, Curso Biomedicina; Diretoria da Saúde, UNINOVE, São Paulo.

### **Jessica Pojato da Silva**

C, Curso Biomedicina; Diretoria da Saúde, UNINOVE, São Paulo.

### **Joseanne Meira Cambuí**

C, Curso Biomedicina; Diretoria da Saúde, UNINOVE, São Paulo.

### **Edgar Matias Bach Hi**

UNILUS (Universidade Lusíadas), Núcleo Acadêmico de Bioquímica Experimental (NABEX), Santos, São Paulo

### **Vinicius de Oliveira Cardoso**

Prof. Depto. Saúde, UNINOVE, São Paulo.  
email:ernabach@gmail.com

### **Erna Elisabeth Bach**

Prof. Depto. Saúde, UNINOVE, São Paulo.  
email:ernabach@gmail.com

**RESUMO:** *Ganoderma lucidum* é cogumelo conhecido popularmente como Reishi pelos japoneses e tem sido empregado principalmente como agente antitumoral, imuno-restaurador, hipotensivo e hipoglicêmico. No Brasil alguns produtores de cogumelo estão iniciando o desenvolvimento de isolados de *Ganoderma lucidum* (*Gan*). O objetivo do presente trabalho

foi realizar extração de *Gan.*, quantificar e, verificar a ação na planta de cevada no controle da mancha foliar causada pelo fungo *Bipolaris sorokiniana*. O extrato foi obtido por extração aquosa e alcoólica sendo usada a mistura do extrato aquoso e 20% de extrato alcoólico perfazendo a solução hidroalcoólica. Este extrato foi avaliado quanto a concentração presente de proteínas, fenóis e beta-glucana. Para indução de resistência foram utilizadas plantas de cevada variedade Elis e aspergidas ou com água, extrato e suspensão de conídios de *Bipolaris sorokiniana* (*Bs*). Os resultados demonstraram que extrato de cogumelo apresentou proteína, fenol e beta glucana. As plantas submetidas ao tratamento com extrato e inoculação com fungo apresentou 65, 68 e 70% de proteção respectivamente para o intervalo de tempo de 24, 48 e 72h. As plantas de cevada com maior proteção apresentaram maior quantidade de proteínas e menor de fenóis quando comparado com plantas infectadas, demonstrando efeito indutor na planta de cevada. O metabolismo na planta pode ter a beta glucana e fenóis como importantes na defesa. Assim, o extrato de *Gan* pode ser usado como indutor de resistência na planta de cevada controlando a doença causada por *Bs* além de proteger o meio ambiente não usando fungicida.

**PALAVRAS-CHAVES:** Ganoderma, indução de resistência, cevada.

**ABSTRACT:** *Ganoderma lucidum* is a mushroom popularly known as Reishi by the Japanese and has been used mainly as an antitumor, immuno-restorative, hypotensive and hypoglycemic agent. In Brazil, some mushroom producers are beginning to develop *Ganoderma lucidum* (*Gan*) isolates. The objective of the present work was to extract *Gan*, quantify and verify the action in the barley plant in the control of the leaf spot caused by the fungus *Bipolaris sorokiniana*. The extract was obtained by aqueous and alcoholic extraction and the mixture of the aqueous extract and 20% of the alcoholic extract was used, making up the hydroalcoholic solution. This extract was evaluated for the present concentration of proteins, phenols and beta-glucan. To induce resistance were used Elis barley plants and sprinkled with water, extract or suspension of conidia of *Bipolaris sorokiniana* (*Bs*). The results showed that mushroom extract presented protein, phenol and beta glucan. The plants submitted to the treatment with extract and inoculation with fungus showed 65, 68 and 70% protection respectively for the time interval of 24, 48 and 72h. Barley plants with higher protection presented higher amounts of proteins and lower phenols when compared to infected plants, demonstrating an inductive effect on the barley plant. The metabolism in the plant may have beta glucan and phenols as important agents in defense. Thus, the *Gan* extract can be used as a resistance inducer in the barley plant by controlling the disease caused by *Bs* besides protecting the environment by not using fungicide.

**KEYWORDS:** *Ganoderma*, resistance induction, barley.

## 1 | INTRODUÇÃO

A cevada é um cereal de inverno, utilizado na industrialização de bebidas, farinhas, medicamentos, produtos dietéticos e sucedâneos de café. Ainda, é empregada na alimentação animal como forragem e na fabricação de rações. No Brasil, a malteação tem sido a principal aplicação econômica da cevada, com o consumo anual pela indústria cervejeira estimada em um milhão de toneladas. A produção está concentrada na Região Sul, com registros de cultivo também nos estados de GO e MG (EMBRAPA, 2018). Aproximadamente, 75% da cevada produzida é utilizada em processamento industrial (na fabricação de malte), 7% é reservada para semente e os 18% restantes na elaboração de rações, por não atingir padrão de qualidade cervejeira. Aproximadamente 95% do malte é destinado para fins cervejeiros (EMBRAPA on line, 2012).

As sementes de cevada, frequentemente, encontram-se infectadas por fungos patogênicos, entre eles *Drechslera teres* e *Bipolaris sorokiniana*. Para evitar a introdução de organismos patogênicos, principalmente em áreas onde se pratica a rotação de culturas, indica-se o tratamento de sementes com fungicidas. A eficácia dos fungicidas indicados para o tratamento de sementes depende, fundamentalmente, da uniformidade de distribuição dos produtos sobre elas (EMBRAPA, 2018).

Em decorrência de condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento de fungos e à suscetibilidade do material em cultivo, a lavoura de cevada pode ter seu

rendimento severamente prejudicado pelo ataque de doenças fúngicas da parte aérea (EMBRAPA, 2018). Para impedir que estas perdas ocorram, utilizam-se fungicidas no controle dos fitopatógenos, podendo afetar o meio ambiente e a saúde do homem, surgindo assim, a necessidade da utilização de substâncias naturais que possam controlar os fitopatógenos impedindo o desenvolvimento das doenças na cevada sem oferecer riscos ao meio ambiente e ao homem. A mancha foliar causada pelo fungo *Bipolaris sorokiniana* é considerada a principal doença da cevada.

Assim, uma forma alternativa de controle de doenças em plantas é pelo uso de indutores de resistência. A indução da resistência consiste no aumento da capacidade de defesa da planta contra amplo espectro de organismos fitopatogênicos, incluindo fungos, bactérias e vírus. A atuação dos indutores de resistência não se dá pela eliminação do patógeno, e sim pela ativação da resistência latente da planta, fazendo com que a entrada ou posterior atividade do patógeno em seus tecidos seja evitada ou atrasada. Existem vários mecanismos de defesa relacionados com a indução de resistência, sendo um deles o pós-formado após tratamento com algum produto natural e formando na planta uma barreira bioquímica, que são substâncias que podem ser tóxicas ao patógeno ou que criam condições que desfavorecem seu desenvolvimento no interior da planta.

A exploração da atividade biológica de compostos secundários presentes em extratos obtidos de cogumelos naturais, pode constituir, uma forma efetiva de controle de doenças em plantas cultivadas. Baseando-se neste princípio, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito curativo e preventivo do extrato de *Ganoderma lucidum* no controle da mancha foliar em plantas de cevada

*Ganoderma lucidum* é conhecido popularmente como Reishi pelos japoneses e, LINGZHI (planta do espírito) pelos chineses. Na China chegou a ser usado como um remédio milagroso para diversas doenças, mesmo que em alguns casos a reivindicação terapêutica fosse exagerada, no entanto atualmente estudos científicos têm comprovado as suas propriedades terapêuticas eficazes (JIN et al, 2012; WACHTEL-GALORET al, 2011). Este cogumelo tem sido empregado principalmente como agente antitumoral, imunorestaurador, hipotensivo e hipoglicemiante (LI et al, 2012; MIZUNO et al., 1995). É utilizado também no tratamento de várias doenças como hepatite, bronquite, hipercolesterolemia e câncer (LIN et al, 2003).

No Brasil alguns produtores de cogumelo estão iniciando o desenvolvimento de isolados de *Ganoderma lucidum* (BACH, 2010) e, segundo WADT et al. (2015), estes isolados desenvolvidos aqui no Brasil possuem proteína, fenol, peroxidase e polifenoxidase, acoplado de taninos, flavonoides, terpenos, anel lactona e açúcares (beta glucanas).

Segundo CASTRO e BACH (2004) e BACH (2003), é possível usar o polissacarídeo de goma xantana, o qual apresenta beta-glucanas, na indução de resistência em plantas de trigo e cevada, para controlar a doença de mancha foliar.

O objetivo do presente trabalho foi realizar extração de compostos de *Ganoderma*

*lucidum*, quantificar e, verificar a ação na planta de cevada no controle da mancha foliar causada pelo fungo *Bipolaris sorokiniana*.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Extração e análises do cogumelo

Corpos de frutificação seco do cogumelo foi oriundo da Firma Vitalli sendo triturado em moinho de bola equipado com filtro de inox de 1mm mesh. O pó foi estocado em ambiente seco até o uso. O pó foi submetido a dois métodos de extração sendo: 1) Extrato aquoso: 30 gramas de pó foram homogeneizados em 100mL de água à 70°C por uma hora e então a mistura foi filtrada em papel Whatmann n°1 e armazenada até o uso. 2) Extrato alcoólico: 30 gramas de pó foram submetidos a um processo de percolação com 50mL de etanol em concentração 70% por uma semana e a solução foi armazenada até o uso. A solução para uso foi preparada pela mistura do extrato 1 com 20% do extrato 2, formando um extrato hidroalcoólico.

Foi realizada a quantificação de proteínas (LOWRY et al., 1951), fenóis (SWAIN & HILLIS, 1959) e beta glucana Lever method (LEVER, 1972).

Compostos fenólicos foram separados no equipamento HPLC (Young Lin YL 9300) equipado com bomba quaternária, detector UV-vis e forno de coluna (YL9330). A coluna usada foi a Kinetex C18 (4.6mm×250mm i.d., 5µm). O comprimento de onda usado foi 254nm. Eluição foi realizada a 1,0mL/min a 35°C. A fase A consiste em metanol e fase B foi 0,1% de ácido acético em água. O volume injetado foi de 20µL. Os compostos usados como padrão foram adquiridos da Sigma (ácidos cumárico, ferúlico, cafeico, rutina, quercetina, kaempferol) e dissolvidos em solvente grau HPLC (metanol). Para identificação foi usado o tempo de retenção e áreas dos picos correlacionados com concentração pelo software Clarity.

### 2.2 Plantas

Para a preparação das plantas foram semeadas dez sementes da cultivar (Embrapa 195) em vasos contendo terra vegetal adubada e, mantidas em casa-de-vegetação à temperatura ambiente até o estágio 5 da escala de Feekes-large (LARGE, 1954).

Grupos de dez plantas foram usadas nos testes biológicos para cada tratamento, em 3 repetições. Em todos os tratamentos foram aspergidos cerca de 10mL da suspensão de conídios ou, solução do extrato ganoderma ou ainda, água. Os tratamentos foram: Grupo a) sadia (plantas aspergidas com água); Grupo b) tratadas com indutor (plantas aspergidas com extrato); Grupo c) inoculadas com os patógenos (plantas aspergidas com suspensões dos isolados); Grupo d) tratadas com indutor e após 24 h inoculadas com suspensão de conídios; Grupo e) idem ao grupo d,

entretanto, após 48 horas; Grupo f) idem ao grupo d, entretanto, após 72 horas.

As plantas dos grupos d, e, f, foram inicialmente aspergidas com indutor sendo que após 24, 48 e, 72 horas, sob condições de temperatura ambiente e fotoperíodo de 12 horas (luz fluorescente 7,35 W m<sup>-2</sup>), as folhas foram inoculadas, por aspersão, com as suspensões de conídios dos isolados.

Durante as primeiras 24 horas após a inoculação do patógeno, as plantas foram mantidas em câmara úmida (100% UR), temperatura ambiente e, escuro. Em seguida, o material foi transferido para casa-de-vegetação e mantido sob condições de temperatura e luminosidade ambiente.

A proteção das plantas foi avaliada 4 dias após a inoculação do patógeno de acordo com BACH et al. (2003) e CASTRO & BACH (2004). As folhas de cevada foram coletadas para a contagem do número de folhas com lesões e calculada a porcentagem de proteção.

Para as análises bioquímicas, 1g das folhas de cada tratamento foi triturada em 5mL de tampão fosfato 0,05mol/L pH=7,0 sendo depois filtrado e armazenado em freezer até realização dos experimentos. Os extratos foram submetidos à quantificação de proteínas através do método de Lowry, em equivalentes de SAB (Soro Albumina Bovina) (LOWRY, 1951) e, quantificação de fenóis baseado no método de SWAIN & HILLIS (1959), em equivalentes de ácido clorogênico.

## 2.3 Análise Estatística

Os dados foram avaliados pela média ± desvio padrão e avaliado por análise de variância One-Way ANOVA sendo considerado significativo \*P <0,05 através do *software* Assistat.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato de *Ganoderma* hidroalcoólico apresentou 0,62mg de proteína, 1,12mg de fenol, 98,7mg de beta glucana (Tabela 1) resultados estes de acordo com o descrito por WADT et al (2015).

Amostra	mg Beta-glucana (1,3; 1-6)	mg Açúcar livre alfa/beta glucan	Proteínas (mg SBA)	Fenóis (mg ácido clorogênico)
Ganoderma	98,7 <sup>a*</sup>	38,15 <sup>a*</sup>	0,62 <sup>a*</sup>	1,12 <sup>a*</sup>

Tabela 1: Concentração de beta glucana, açúcar livre, proteínas e fenóis (mg/por 1g do pó) presente no *Ganoderma lucidum*

\*Média de 5 amostras de fungo. Letra <sup>a</sup> na colunas indicam que os valores das 5 amostras foram semelhantes. Test Tukey (ANOVA).

SBA=soro albumina bovina

Compostos fenólicos possuem ação antioxidante e dentro do extrato de cogumelo foram encontrados fenóis como ácido cumárico, caféico, ferúlico, rutina e quercetina, podendo ser importantes no mecanismo de defesa da planta de cevada (Tabela 2).

Extrato	Ácido cumárico	Ácido caféico	Ácido ferúlico	rutina	quercetina
Ganoderma	1.46	0.20	18.19	12.21	2.68

Tabela 2: Quantidade de ácido cumárico, caféico, ferúlico, rutina e quercetina em ug/mL presente no extrato de Ganoderma pela análise no HPLC.

Na Tabela 3, pode-se observar que plantas de cevada tratadas com extrato de *Ganoderma* apresentaram indução de resistência em até 70% quando comparado com plantas infectadas isto porque as plantas infectadas apresentaram todas as folhas com 100% de lesão. Nas plantas sadias e infectadas, tem-se que plantas sadias apresentam maior quantidade de proteína e menor de fenol sendo ao contrário em plantas infectadas quando estas apresentam baixa quantidade de proteína e maior quantidade de fenol podendo ser pelo ataque do patógeno na planta que apresenta a reação necrotrófica. Por este motivo, as plantas de cevada da cultivar Elis, quando inoculadas com o patógeno e denominadas de infectadas, apresentaram a maior concentração de fenol.

Já nas plantas de cevada, em relação ao tratamento, com o aumento no intervalo de tempo, apresentou aumento na quantidade de proteínas e diminuição de fenol como, por exemplo, a planta no intervalo de 72h está com 0,97mg de proteína e a planta sadia com 0,773 mg de proteína, traduzindo em 70% de proteção em relação a planta infectada. O mesmo ocorreu com o fenol sendo diminuído com o intervalo de tempo. Isto vem de acordo com CASTRO & BACH (2004), onde em plantas de cevada tratadas com elicitor goma xantana observaram que a concentração de proteínas sempre foi maior. Entretanto, em relação a concentração de fenóis, o valor sempre diminuiu.

Compostos como beta-glucana e fenóis pode estar envolvido no mecanismo de proteção das plantas de cevada agindo como antioxidantes e fazendo com que a planta de cevada reaja com seu mecanismo de defesa impedindo a entrada do patógeno.

Tratamentos	% de proteção*	proteína mg <sup>1</sup>	fenol mg <sup>1</sup>
Sadia (controle água)	x	0,773a	0,590a
Controle (extrato)	x	0.565a	0.192a
Gan 24h	65,0 b**	0.970a	0.210a
Gan 48h	68,0 b	0.971a	0.186a
Gan 72h	70,0 b	0.976a	0.149a
Infectada	0,0 a	0,255b	0,811b

Tabela 3: Porcentagem de proteção em folhas de plantas de cevada variedade Elis, utilizando extrato hidroalcoólico de ganoderma como indutor, nos diferentes intervalos de tempo.

\*Porcentagem de proteção seguidas por letra b, são significativamente diferentes das plantas infectadas, pelo teste T ( $P < 0,05$ ). Números representam média de um total de 30 folhas/tratamento.

## 4 | CONCLUSÃO

O extrato hidroalcoólico de *Ganoderma*, provou ser potente indutor de resistência não necessitando de uso de fungicida auxiliando assim a não poluição do meio ambiente e na manutenção da qualidade de vida e alimento para o ser humano.

## AGRADECIMENTO

Ao CNPq pelo suporte financeiro (Processo 474681/2013).

## REFERÊNCIAS

BACH, E. E. 2010. Biotecnologia aplicada a cogumelos. In: **Cogumelos Medicinais: Aspectos de Cultivo e Aplicações**/Marli Gerenutti, Organização. Sorocaba: EDUNISO; p. 19.

BACH, E. E.; BARROS, B. C.; KIMATI, H. Induced resistance against *Bipolaris bicolor*, *Bipolaris sorokiniana* and *Drechslera tritici-repentis* in wheat leaves by xanthan gum and heat-inactivate conidia suspension. **Journal of Phytopathology**, 151: 411-418, 2003.

CASTRO, O.; BACH, E.E. Increased production of b-1,3 glucanase and proteins in *Bipolaris sorokiniana* pathosystems treated using commercial xanthan gum. **Plant Physiology and Biochemistry**, 42: 165-169, 2004.

EMBRAPA. A Cevada no Brasil. **Embrapa** on line documento 139, 2012. [http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p\\_do139\\_4.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do139_4.htm)

EMBRAPA. Cultivo da cevada. <https://www.embrapa.br/trigo>, 2018.

JIN, X.; RUIZ BEGUERIE, J.; SZE, D.M.; CHAN, G.C. Ganoderma lucidum (Reishi mushroom) for cancer treatment. **Cochrane Database Syst Rev.**, 13(6):CD007731, 2012.

LARGE, E.C. Growth stages in cereal: Illustration of the Feekes scale. **Plant Pathology**, New York. 3: 129, 1954.

LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, 47: 273-279, 1972.

LI, FENGLIN; ZHANG, YIMING; ZHONG, ZHIJIAN. Antihyperglycemic Effect of Ganoderma Lucidum Polysaccharides on Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. **International Journal Of Molecular Sciences**, 12: 6135-6145, 2011.

LIN, S.B.; LI, C.H.; LEE, S.S.; KAN, L.S.. Triterpene-enriched extracts from *Ganoderma lucidum* inhibit growth of hepatoma cells via suppressing protein kinase C, activating mitogen-activated protein kinases and G2-phase cell cycle arrest. **Life Sciences**, 72: 2381-2390, 2003.

LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal Biological Chemistry**, 193: 265-275, 1951.

MIZUNO, T.; WANG, G.; ZHANG, J.; KAWAGISHI, H.; NISHITOBA, T.; LI, J. Reishi, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*: bioactive substances and medicinal effects. **Food Reviews International**, 11:151-166, 1995.

SWAIN, R.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 10: 63-68, 1959.

WADT, N.S.Y.; OKAMOTO, M.K.H.; HI, E.M.B.; BACH, E.E. Chemical, toxicological, anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of *Ganoderma lucidum* extracts. **Emirates journal of Food and Agricult.** 27: 1, 2015.

WACHTEL-GALOR, S.; YUEN, J.; BUSWELL, J.A.; BENZIE, I.F.F. Chapter 9. *Ganoderma lucidum* (Lingzhi or Reishi). A Medicinal Mushroom. In: *Herbal Medicine*, 2nd edition, Biomolecular and Clinical Aspects. Editors: Iris F. F. Benzie and Sissi Wachtel-Galor. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2011.

## **SOBRE OS ORGANIZADORES**

**NAYARA ARAÚJO CARDOSO** Graduada com titulação de Bacharel em Farmácia com formação generalista pelo Instituto Superior de Teologia Aplicada – INTA. Especialista em Farmácia Clínica e Cuidados Farmacêuticos pela Escola Superior da Amazônia – ESAMAZ. Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral. Membro do Laboratório de Fisiologia e Neurociência, da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, no qual desenvolve pesquisas na área de neurofarmacologia, com ênfase em modelos animais de depressão, ansiedade e convulsão. Atualmente é Farmacêutica Assistente Técnica na empresa Farmácia São João, Sobral – Ceará e Farmacêutica Supervisora no Hospital Regional Norte, Sobral – Ceará.

**RENAN RHONALTY ROCHA** Graduado com titulação de Bacharel em Farmácia com formação generalista pelo Instituto Superior de Teologia Aplicada - INTA. Especialista em Gestão da Assistência Farmacêutica e Gestão de Farmácia Hospitalar pela Universidade Cândido Mendes. Especialista em Análises Clínicas e Toxicológicas pela Faculdade Farias Brito. Especialista em Farmácia Clínica e Cuidados Farmacêuticos pela Escola Superior da Amazônia - ESAMAZ. Especialista em Micropolítica da Gestão e Trabalho em Saúde do Sistema Único de Saúde pela Universidade Federal Fluminense. Farmacêutico da Farmácia Satélite da Emergência da Santa Casa de Sobral, possuindo experiência também em Farmácia Satélite do Centro Cirúrgico. Membro integrante da Comissão de Farmacovigilância da Santa Casa de Misericórdia de Sobral. Farmacêutico proprietário da Farmácia Unifarma em Morrinhos. Foi coordenador da assistência farmacêutica de Morrinhos por dois anos. Mestrando em Biotecnologia pela Universidade Federal do Ceará.

**MARIA VITÓRIA LAURINDO** Graduada com titulação de Bacharel em Enfermagem pelo Centro Universitário INTA – UNINTA. Foi bolsista no hospital da Santa Casa de Misericórdia de Sobral (SCMS) no setor de Quimioterapia, participei do programa de monitoria na disciplina de Patologia Humana e fui integrante do Projeto de Extensão Humanização Hospitalar. Assim como, desenvolvi ações em educação e saúde como extensionista para pacientes parturientes no hospital Santa Casa de Sobral (SCMS).

Agência Brasileira do ISBN  
ISBN 978-85-7247-216-6

