

**José Max Barbosa de Oliveira Junior  
(Organizador)**

# **Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza 3**

**Atena**  
Editora  
Ano 2019

José Max Barbosa de Oliveira Junior  
(Organizador)

# Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza 3

Atena Editora  
2019

2019 by Atena Editora  
Copyright © Atena Editora  
Copyright do Texto © 2019 Os Autores  
Copyright da Edição © 2019 Atena Editora  
Editora Executiva: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Antonella Carvalho de Oliveira  
Diagramação: Natália Sandrini  
Edição de Arte: Lorena Prestes  
Revisão: Os Autores

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

### **Conselho Editorial**

#### **Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**

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  
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristina Gaio – Universidade de Lisboa  
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia  
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie de Maria Ausiliatrice  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Juliane Sant’Ana Bento – Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

#### **Ciências Agrárias e Multidisciplinar**

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista  
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará  
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas



### **Ciências Biológicas e da Saúde**

Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria  
Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina  
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

### **Ciências Exatas e da Terra e Engenharias**

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto  
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

### **Conselho Técnico Científico**

Prof. Msc. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico  
Prof. Msc. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof.<sup>a</sup> Msc. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia  
Prof. Msc. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista  
Prof. Msc. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão  
Prof.<sup>a</sup> Msc. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal  
Prof. Msc. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará

<b>Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)</b>	
A532	Análise crítica das ciências biológicas e da natureza 3 [recurso eletrônico] / Organizador José Max Barbosa de Oliveira Junior. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019. – (Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza; v. 3)  Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader. Modo de acesso: World Wide Web. Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-359-0 DOI 10.22533/at.ed.590192705  1. Ciências biológicas – Pesquisa – Brasil. I. Oliveira Junior, José Max Barbosa de. II. Série.  CDD 610.72
<b>Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422</b>	

Atena Editora  
Ponta Grossa – Paraná - Brasil  
[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)  
contato@atenaeditora.com.br



## APRESENTAÇÃO

A obra *“Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza”* consiste de uma série de livros de publicação da Atena Editora. Com 96 capítulos apresenta uma visão holística e integrada da grande área das Ciências Biológicas e da Natureza, com produção de conhecimento que permeiam as mais distintas temáticas dessas grandes áreas.

Os 96 capítulos do livro trazem conhecimentos relevantes para toda comunidade acadêmico-científica e sociedade civil, auxiliando no entendimento do meio ambiente em geral (físico, biológico e antrópico), suprimindo lacunas que possam hoje existir e contribuindo para que os profissionais tenham uma visão holística e possam atuar em diferentes regiões do Brasil e do mundo. Os estudos que integram a *“Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza”* demonstram que tanto as Ciências Biológicas como da Natureza (principalmente química, física e biologia) e suas tecnologias são fundamentais para promoção do desenvolvimento de saberes, competências e habilidades para a investigação, observação, interpretação e divulgação/interação social no ensino de ciências (biológicas e da natureza) sob pilares do desenvolvimento social e da sustentabilidade, na perspectiva de saberes multi e interdisciplinares.

Em suma, convidamos todos os leitores a aproveitarem as relevantes informações que o livro traz, e que, o mesmo possa atuar como um veículo adequado para difundir e ampliar o conhecimento em Ciências Biológicas e da Natureza, com base nos resultados aqui dispostos.

Excelente leitura!

José Max Barbosa de Oliveira Junior

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
INIBIÇÃO DA PEÇONHA DE <i>Bothrops alternatus</i> (URUTU) 'IN VIVO' PELO PRINCÍPIO ATIVO ISOLADO VEGETAL LUPEOL	
Benedito Matheus dos Santos Klaus Casaro Saturnino Vanderlúcia Fonseca de Paula Mirian Machado Mendes	
<b>DOI 10.22533/at.ed.5901927051</b>	
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>7</b>
INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES TÓXICA, ANTIDIARREICA E ANTIESPASMÓDICA DAS PARTES AÉREAS DE <i>SIDA RHOMBIFOLIA</i> L. (MALVACEAE)	
Rafael Lima Marinho Paiva Antônio Raphael Lima de Farias Cavalcanti Rayane Fernandes Pessoa Indyra Alencar Duarte Figueiredo Sarah Rebeca Dantas Ferreira Otemberg Souza Chaves Micaelly da Silva Oliveira Maria de Fátima Vanderlei de Souza Fabiana de Andrade Cavalcante	
<b>DOI 10.22533/at.ed.5901927052</b>	
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>22</b>
INVESTIGAÇÃO DE LECTINA E INIBIDOR DE TRIPSINA EM TUBÉRCULOS DE INHAME ( <i>Dioscorea alata</i> ) CULTIVADO NO NORDESTE DO BRASIL	
Julia Mariano Caju de Oliveira Edilza Silva do Nascimento Tatiane Santi Gadelha Carlos Alberto de Almeida Gadelha	
<b>DOI 10.22533/at.ed.5901927053</b>	
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>38</b>
ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS ALERGÊNICOS ENCONTRADOS EM PEÇAS ANATÔMICAS HUMANAS CONSERVADAS EM SOLUÇÃO DE FORMALDEÍDO	
Hércules Gonçalves de Almeida Medeiros Adna Cristina Barbosa de Sousa	
<b>DOI 10.22533/at.ed.5901927054</b>	
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	<b>50</b>
MEIO AMBIENTE GENÉTICO E EMBRIÕES EXCEDENTÁRIOS	
Odair Bufolo Daiane Silva Berdusco Freire Andréia de Fátima Selvati Bredariol	
<b>DOI 10.22533/at.ed.5901927055</b>	

**CAPÍTULO 6 ..... 62**

PRODUÇÃO DE ÁCIDOS PROPANOICO E ACÉTICO POR PROPIONIBACTERIUM ACIDIPROPIONICI ADSORVIDA EM MONTMORILONITA K-10

Taciani do Santos Bella de Jesus  
Lucidio Cristovão Fardelone  
Gustavo Paim Valença  
José Roberto Nunhez  
José Augusto Rosário Rodrigues  
Paulo José Samenho Moran

**DOI 10.22533/at.ed.5901927056**

**CAPÍTULO 7 ..... 72**

PRODUÇÃO DE B-GLUCANASES E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E REDUÇÃO DE BIOFILME DE *Candida albicans*

Glaucia Hollaender Braun  
Henrique Pereira Ramos  
Maria Laura Lucas Natal  
Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

**DOI 10.22533/at.ed.5901927057**

**CAPÍTULO 8 ..... 80**

PRODUCTION AND STABILITY OF LIPASE AND PECTINASE PRESENT IN AGROINDUSTRIAL RESIDUES

Millena Cristiane de Medeiros Bezerra Jácome  
Carlos Eduardo de Araújo Padilha  
Murilo Ricardo do Nascimento Arrais  
Maria Cecília Bezerra Caldas  
Everaldo Silvino dos Santos

**DOI 10.22533/at.ed.5901927058**

**CAPÍTULO 9 ..... 84**

PROPRIEDADES FÍSICAS E MECÂNICAS DE UM CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO APÓS ADIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE TiO<sub>2</sub>

Luis Eduardo Genaro  
Luana Mafra Marti  
Ana Carolina Bosco Mendes  
Rafael Amorim Martins  
Angela Cristina Cilense Zuanon

**DOI 10.22533/at.ed.5901927059**

**CAPÍTULO 10 ..... 91**

PURIFICATION OF A XYLANASE FROM *Penicillium crustosum* AND ITS POTENTIAL USE IN CLARIFYING FRUIT JUICE

Jaina Caroline Lunkes  
Vanessa Cristina Arfelli  
Jorge William Fischdick Bittencourt  
Rafael Andrade Menolli  
Alexandre Maller  
Jose Luís da Conceição Silva  
Rita de Cássia Garcia Simão  
Marina Kimiko Kadowaki

**DOI 10.22533/at.ed.59019270510**



**CAPÍTULO 11 ..... 101**

SENSIBILIDADE CELULAR E DE BIOFILME DE *Enterococcus* sp. AOS DESINFETANTES DE USO INDUSTRIAL

Luciana Furlaneto Maia  
Naieli Mücke  
Márcia Regina Terra  
Danielle Karine Ohashi  
Talita Butzske Bússolo  
Márcia Cristina Furlaneto

**DOI 10.22533/at.ed.59019270511**

**CAPÍTULO 12 ..... 115**

SIMULAÇÃO NUMÉRICA DA PROPAGAÇÃO DE ONDAS CISALHANTES EM ROCHAS SEDIMENTARES A PARTIR DE IMAGENS MICROTOMOGRÁFICAS DE RAIOS X

Túlio Medeiros  
José Agnelo Soares  
Ronildo Otávio de Oliveira Neto  
Juliana Targino Batista

**DOI 10.22533/at.ed.59019270512**

**CAPÍTULO 13 ..... 127**

STABILITY OF PECTINASE OF ASPERGILLUS NIGER IOC 4003 IN DIFFERENT SALTS FOR PURIFICATION IN BIPHASIC AQUEOUS SYSTEM

Millena Cristiane de Medeiros Bezerra Jácome  
Murilo Ricardo do Nascimento Arrais  
Carlos Eduardo de Araújo Padilha  
Everaldo Silvino dos Santos

**DOI 10.22533/at.ed.59019270513**

**CAPÍTULO 14 ..... 131**

TÉCNICA DE FISH APLICADA NA IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA DE REATOR DE LODO ATIVADO UTILIZADO NA DEGRADAÇÃO DE BLENIDAS

Lívia Cordi  
Nelson Durán

**DOI 10.22533/at.ed.59019270514**

**CAPÍTULO 15 ..... 142**

TEMPERATURE AND pH EFFECTS ON THE ACTIVITY AND STABILITY OF THR XYLANASES PRODUCED BY THE THERMOPHILIC FUNGUS *Rasamsonia emersonii* S10

Jéssica de Araujo Zandoni  
Eleni Gomes  
Gustavo O. Bonilla-Rodriguez

**DOI 10.22533/at.ed.59019270515**

**CAPÍTULO 16 ..... 147**

TRIAGEM DE TRATAMENTO DE *Luffa cylindrica* PARA IMOBILIZAÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae* VISANDO A PRODUÇÃO DE INVERTASE

Beatriz Paes Silva  
Brenda Kischkel  
Nicolle Ramos dos Santos  
André Álvares Monge Neto

**DOI 10.22533/at.ed.59019270516**

**CAPÍTULO 17 ..... 159**

AÇÃO FIBRINOLÍTICA DE PROTEASES PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE AMBIENTES AMAZÔNICOS

Thayana Cruz de Souza  
Anni Kelle Serrão de Lima  
Michele Silva de Jesus  
Raimundo Felipe da Cruz Filho  
Wim Maurits Sylvain Degrave  
Leila de Mendonça Lima  
Ormezinda Celeste Cristo Fernandes

**DOI 10.22533/at.ed.59019270517**

**CAPÍTULO 18 ..... 164**

ÁCIDO CÍTRICO: UM ENFOQUE MOLECULAR

Letícia Fernanda Bossa  
Daniele Sartori

**DOI 10.22533/at.ed.59019270518**

**CAPÍTULO 19 ..... 174**

ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DE MANGUEZAL E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Gabriela Xavier Schneider  
Jean Carlos Ramos de Almeida  
Kassiely Zamarchi  
Débora Santos  
Danyelle Stringari  
Renata Rodrigues Gomes

**DOI 10.22533/at.ed.59019270519**

**CAPÍTULO 20 ..... 188**

IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS COM A CAPACIDADE DE BIODEGRADAÇÃO DO HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO

Juliana Barbosa Succar  
Andressa Sbrano da Silva  
Lidiane Coelho Berbert  
Vinícius Ribeiro Flores  
João Victor Rego Ferreira  
Alexander Machado Cardoso  
Ida Carolina Neves Direito

**DOI 10.22533/at.ed.59019270520**

**CAPÍTULO 21 ..... 199**

REABILITAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS PELA MINERAÇÃO DE QUARTZITO COM INSTALAÇÃO DE USINA SUSTENTÁVEL

Gabriel Silva Gomes

**DOI 10.22533/at.ed.59019270521**

<b>CAPÍTULO 22</b> .....	<b>218</b>
COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E TOXICIDADE DAS FOLHAS DE <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez (LAURACEAE)	
Viviane Mallmann	
Lucas Wagner Ribeiro Aragão	
Edineia Messias Martins Bartieres	
Valdeci José Pestana	
Shaline Séfara Lopes Fernandes	
Rogério César de Lara da Silva	
Tauane Catilza Lopes Fernandes	
Ana Francisca Gomes da Silva	
<b>DOI 10.22533/at.ed.59019270522</b>	
<b>CAPÍTULO 23</b> .....	<b>223</b>
CRESCIMENTO DE MUDAS DE <i>Dipteryx odorata</i> (Aubl.) Willd. (Fabaceae) EM SUBSTRATOS ORGÂNICOS COMPOSTOS COM RESÍDUOS DE CASTANHA-DO-BRASIL	
Givanildo Sousa Gonçalves	
Lúcia Filgueiras Braga	
Letícia Queiroz de Souza Cunha	
<b>DOI 10.22533/at.ed.59019270523</b>	
<b>CAPÍTULO 24</b> .....	<b>236</b>
SUBSTRATOS ORGÂNICOS NO CRESCIMENTO DE MUDAS DE <i>Dipteryx odorata</i> (Aubl.) Willd. (Fabaceae)	
Givanildo Sousa Gonçalves	
Lúcia Filgueiras Braga	
Letícia Queiroz de Souza Cunha	
<b>DOI 10.22533/at.ed.59019270524</b>	
<b>SOBRE O ORGANIZADOR</b> .....	<b>253</b>



## INIBIÇÃO DA PEÇONHA DE *Bothrops alternatus* (URUTU) 'IN VIVO' PELO PRINCÍPIO ATIVO ISOLADO VEGETAL LUPEOL

### **Benedito Matheus dos Santos**

Universidade Federal de Goiás – Regional  
Jataí, Unidade Acadêmica Especial de Ciências  
Agrárias, Jataí – Goiás

### **Klaus Casaro Saturnino**

Universidade Federal de Goiás – Regional  
Jataí, Unidade Acadêmica Especial de Ciências  
Agrárias, Jataí – Goiás

### **Vanderlúcia Fonseca de Paula**

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia,  
Departamento de Química e Exatas, Jequié –  
Bahia

### **Mirian Machado Mendes**

Universidade Federal de Goiás – Regional Jataí,  
Unidade Acadêmica Especial de Biociências, Jataí  
– Goiás

**RESUMO:** A maioria dos acidentes ofídicos no Brasil ocorrem com serpentes do gênero *Bothrops*. A peçonha botrópica é constituída de enzimas e toxinas não enzimáticas, que atuam sinergicamente, provocando severos danos teciduais locais como edema, dor intensa, sangramento e necrose severa. Metabólitos secundários vegetais tem sido cada vez mais estudados como inibidores de toxinas encontradas em peçonhas de serpentes. Neste contexto, o presente trabalho visou avaliar a inibição do dano causado pela peçonha de *Bothrops alternatus*, utilizando amostras resultantes da incubação da peçonha

bruta (20µg) com o princípio ativo Lupeol, nas concentrações de 1:20 e 1:50, (m/m). Os resultados permitiram perceber que o Lupeol apresenta a capacidade de inibir algumas das toxinas presentes na peçonha que provocam hemorragia e necrose.

**PALAVRAS-CHAVE:** Inibição, Lupeol, Necrose, Peçonha.

**ABSTRACT:** Most ophidian accidents in Brazil occur with *Bothrops* snakes. The botropic venom consists of non-enzymatic enzymes and toxins that act synergistically, causing severe local tissue damage such as edema, severe pain, bleeding, and severe necrosis. Vegetal secondary metabolites have been increasingly studied as inhibitors of toxins found in snake venoms. In this context, the present work aimed to evaluate the inhibition of the damage caused by the venom of *Bothrops alternatus*, using samples resulting from the incubation of the crude venom (20µg) with the active principle Lupeol at ratio of 1:20 and 1:50 (w/w). It was possible to notice that Lupeol is able to inhibit the some toxins present in the venom causing hemorrhage and necrosis.

**KEYWORDS:** Inhibition, Lupeol, Necrosis, Venom.

## 1 | INTRODUÇÃO

Segundo o Ministério da Saúde, ocorrem cerca de 22 mil acidentes ofídicos por ano no Brasil, dos quais, cerca de 90,5% ocorrem com serpentes do gênero *Bothrops* (Jararacas) (BARRAVIEIRA, 1993; FUNASA, 2001; FUNDACENTRO, INSTITUTO BUTÃTAN, 2001). Segundo a Coordenação Nacional de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos do Ministério da Saúde, o coeficiente de incidência é de 13,5 acidentes/100.000 habitantes e na região Centro-Oeste o índice é de 33 acidentes/100.000 habitantes.

A peçonha ofídica é constituída basicamente de proteínas (90 a 94% do peso seco), compreendendo enzimas e toxinas não enzimáticas. Esse “pool” de proteínas atua, sinergicamente, provocando severos danos teciduais locais, como edema, sangramento e necrose e sistemicamente essas proteínas prolongam o tempo de coagulação, além de causar hemorragias em locais distantes da picada.

Metabólitos secundários vegetais tem sido cada vez mais estudados visando diversas aplicações, incluindo a atuação como inibidores de toxinas ofídicas. Oliveira (2011) avaliou a capacidade de neutralização do veneno de *Bothrops jararaca* pelo extrato vegetal de *Clusia fluminensis*, muitas outras espécies vegetais já tiveram seu efeito antiofídico comprovado cientificamente, como por exemplo *Schizolobium parahyba* (MENDES, et al. 2008) e *Bombacopsis glabra*, da qual se isolou o composto p-cumarato de triacontila (MENDES, et al. 2013).

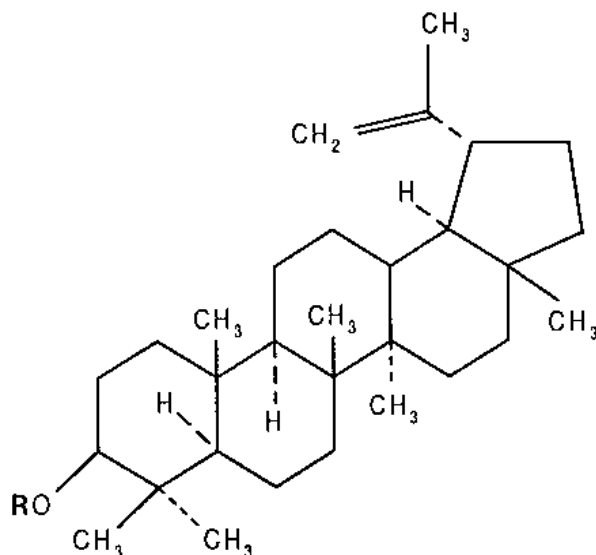
## 2 | OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a inibição do dano tecidual local causado pela peçonha de *Bothrops alternatus* (urutu), no músculo gastrocnêmio de camundongos, pelo princípio ativo isolado Lupeol (triterpenóide presente em frutas).

## 3 | MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Lupeol

O princípio ativo isolado vegetal Lupeol é um triterpenóide, que pertence à classe dos terpenos.



**LUPEOL, R = H**

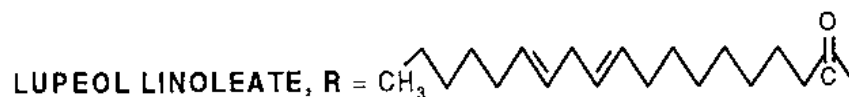


Figura 1 – Estrutura química do Lupeol. Fonte: GEETHA & VARALAKSHMI, 2001

### 3.2 Peçonha

Foi utilizada a peçonha de *Bothrops alternatus* liofilizada foi gentilmente doada pelo prof. Dr. Luiz Fernando Moreira Izidoro, armazenada em freezer a  $-18^{\circ}\text{C}$ , a mesma foi parcialmente reconstituída em solução de NaCl 0,9%, posteriormente a concentração de proteínas foi mensurada através de dosagem de proteínas totais pelo método de Biureto (GORNALL, et al. 1949), para que a dose a ser utilizada fosse estipulada.

### 3.3 Animais

O modelo animal utilizado para o experimento foi camundongo Swiss, adulto, fêmea pesando 18-22g cedido pelo biotério central da Universidade Federal de Goiás. A utilização do animais seguiu metodologia conforme descrito e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de animais da Regional Jataí, Protocolo: CEUA/UFG – 106/2015

### 3.4 Metodologia

Para avaliar a atividade miotóxica foram utilizadas amostras resultantes da incubação da peçonha bruta de *B. alternatus* (20  $\mu\text{g}$ ) com o princípio ativo Lupeol, durante 15 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ , em duas razões (1:20 e 1:50, m/m), nos testes 1 e 2, respectivamente. As amostras, após a incubação, foram aplicadas no músculo gastrocnêmio direito de camundongos Swiss (n=3).



Após 3 horas os animais foram anestesiados e eutanasiados com sobredose de Xilazina 300 mg/kg e Cetamina 32 mg/kg, via *IP*. Também foram realizados controles negativo e positivo com solução de NaCl 0,9% (m/v), Lupeol (1000ug) e peçonha bruta (20ug), respectivamente. Após eutanásia, foi realizada a coleta do músculo inoculado para análise, o qual foi preservado em formol a 10%.

Posteriormente, realizou-se o processamento para desidratação, diafanização e parafinização das amostras, e posterior confecção das laminas histológicas que foram coradas pela bateria de coloração hematoxilina-eosina (HE). Após a confecção das laminas histológicas, foi realizada a análise em microscópio óptico em maior e menor aumento.

#### 4 | RESULTADOS/DISCUSSÃO

Os extratos vegetais e os princípios ativos isolados constituem uma interessante fonte de compostos capazes de atuar de diversas formas sobre patologias, consistindo em um promissor e interessante campo de descobertas.

A fisiopatologia do envenenamento botrópico é caracterizada pela presença de intensa hemorragia nas primeiras 3 horas após o acidente podendo evoluir para necrose e processos inflamatórios, culminando em perda tecidual.

Com a realização das análises histológicas do material coletado (figura 2), constatou-se que o grupo controle positivo (figura A), o qual recebeu a aplicação apenas da peçonha apresentou intensa hemorragia, bem como alterações como, distanciamento e fragmentação das fibras musculares, congestão e presença de infiltrado inflamatório, evidenciando também o edema proeminente e a desorganização e morte das células por necrose.

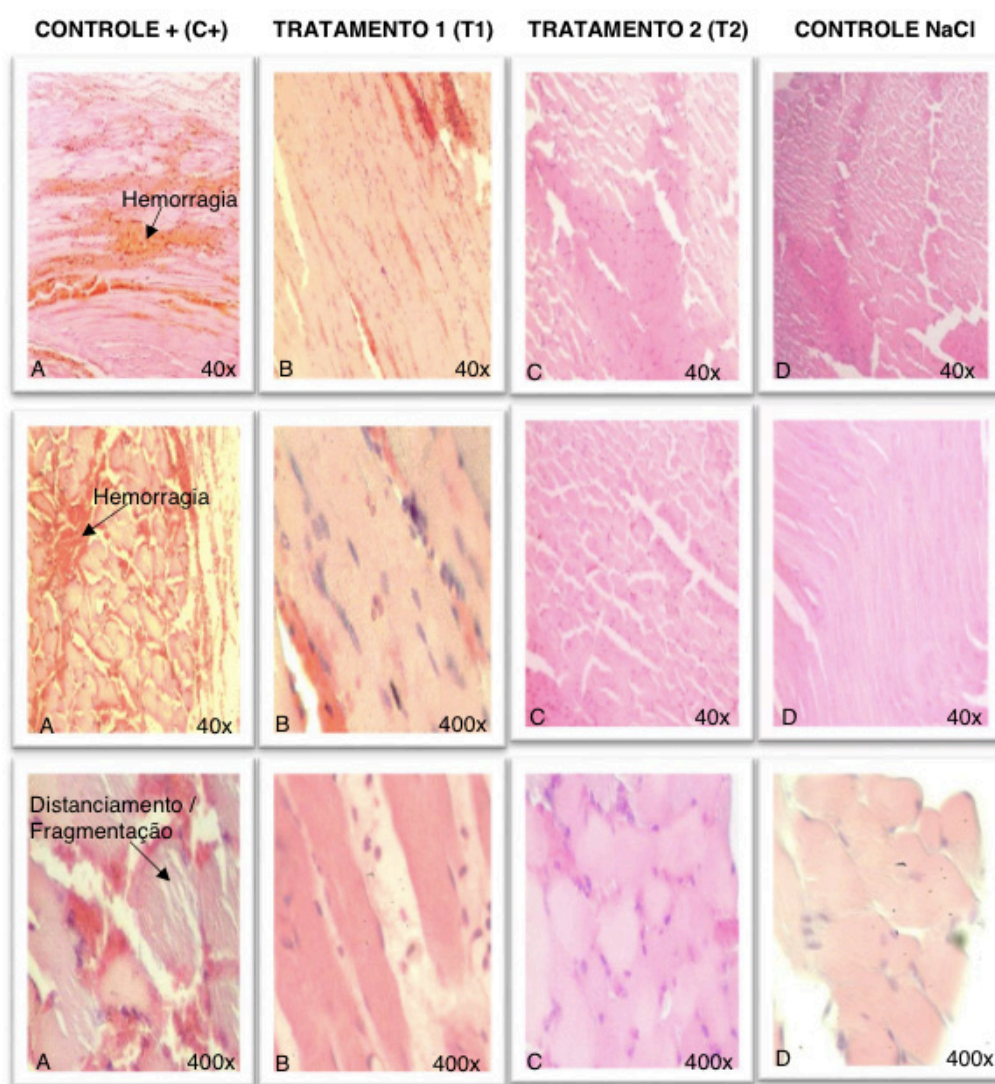
O grupo 1 (figura B) que recebeu a peçonha combinada com Lupeol, na razão de 1:20 (m/m), exibiu uma melhor estruturação do tecido muscular quando comparado ao grupo controle com apenas peçonha. Foi possível visualizar a diminuição da hemorragia e considerável redução da congestão e ausência de fibras desfragmentadas. Na análise do grupo 2 que recebeu peçonha combinada com Lupeol na razão de 1:50 (m/m), constatou-se que o tecido se apresentava com uma maior homogeneidade, poucos focos hemorrágicos de menor intensidade e significativa redução de infiltrado inflamatório.

A mionecrose é o evento de morte de células do tecido muscular, caracterizada pela desorganização do citoplasma, seguido da perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular, sendo possível observar no tecido a perda das estriações transversais das fibras e o afluxo de células inflamatórias (GRIVICICH, et al 2007).

As toxinas capazes de provocar hemorragia são capazes também de causar a mionecrose, de modo secundário, devido a isquemia causada pelo déficit de sangue ocasionando prejuízo na irrigação dos tecidos próximos a picada. Essas toxinas são

capazes de destruir a matriz extracelular e a membrana basal endotelial, causando danos a microvasculatura e ao arranjo estrutural do tecido muscular (Gutiérrez et al. 2009).

A análise e comparação dos músculos inoculados com os controles peçonha (figura 2 A) e solução salina (NaCl 0,9%) (figura 2 D) mostram a magnitude do dano causado por 20ug de peçonha de *B. alternatus*. A análise histopatológica dos músculos que receberam o princípio ativo Lupeol, combinado com a peçonha (figura 2 B e C) permite afirmar que o composto tem a capacidade de inibir toxinas hemorrágicas e é parcialmente capaz de neutralizar o efeito miotóxico da peçonha. O composto Lupeol não causou hemorragia ou necrose no tecido muscular quando inoculado (resultado não mostrado).



**Figura 2** - Análise histopatológica de seções do musculo gastrocnemio de camundongos inoculados com peçonha de *B. alternatus*, eutanasiados após 3 horas, analisados em aumentos de 40x e 400x por microscopia de luz. A) Peçonha de *B. alternatus* (C+) 20 ug, B) Peçonha de *B. alternatus* + Lupeol 1:20 m/m (T1), C) Peçonha de *B. alternatus* + Lupeol 1:50 m/m (T2), D) Solução salina NaCl 0,9%. (m/v).

## 5 | CONCLUSÕES

Os resultados permitem concluir que o composto Lupeol apresenta capacidade de inibir toxinas presentes na peçonha que provocam hemorragia e que causam necrose por isquemia. Novos testes devem ser realizados para avaliar esse mecanismo de inibição e avaliar se o princípio ativo Lupeol é efetivo em inibir outras classes de toxinas existentes na peçonha botrópica.

## REFERÊNCIAS

BRASIL. **Ministério da Saúde. Incidência de acidentes por serpentes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2016.** Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/1025-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/animais-peconhentos-serpentes/12-animais-peconhentos-serpentes/13712-situacao-epidemiologica-dados>>. Acessado em: 12/09/2017.

FUNASA, FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos.** 2ª ed. Brasília: Funasa, 2001.

FUNDACENTRO, MINISTERIO DO TRABALHO E EMPREGO. **PREVENÇÃO DE ACIDENTES COM ANIMAIS PEÇONHENTOS.** INSTITUTO BUTANTÃ São Paulo 2001.

GEETHA, T.; VARALAKSHMI, P. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 76, n. 1, p. 77-80, 2001.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M.; J. **Biol.Chem.**, 177-751, 1949.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 53, p. 335-343, 2007.

GUTIÉRREZ, J. M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by Bothrops asper snake venom. **Toxicon**, v. 54, p. 976-987, 2009.

MENDES, M. M.; OLIVEIRA, C. F.; LOPES, D. S.; VALE, L. H. F.; ALCÂNTARA, T. M.; IZIDORO, L. F. M.; RODRIGUES, V. M. Anti-snake venom properties of *Schizolobium parahyba* (Caesalpinoideae) aqueous leaves extract. **Phytotherapy research**, v. 22, n. 7, p. 859-866, 2008.

MENDES, M. M.; VIEIRA, S. A. P. B.; GOMES, M. S. R.; PAULA, V. F.; ALCÂNTARA, T. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; DOS SANTOS, J. L.; MAGRO, A. J.; FONTES, M. R. M.; RODRIGUES, V. M. Triacontyl p-coumarate: An inhibitor of snake venom metalloproteinases. **Phytochemistry**, v. 86, p. 72-82, 2013.

OLIVEIRA, Eduardo Coriolano de. Avaliação dos extratos vegetais de *Clusia fluminensis planch & triana* na neutralização de atividades biológicas provocadas pelo veneno de *Bothrops jararaca*. 2011.

## INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES TÓXICA, ANTIDIARREICA E ANTIESPASMÓDICA DAS PARTES AÉREAS DE *SIDA RHOMBIFOLIA* L. (MALVACEAE)

### **Rafael Lima Marinho Paiva**

Universidade Federal da Paraíba, Graduação em Farmácia  
João Pessoa - PB

### **Antônio Raphael Lima de Farias Cavalcanti**

Universidade Federal da Paraíba, Graduação em Farmácia  
João Pessoa - PB

### **Rayane Fernandes Pessoa**

Universidade Federal da Paraíba, Graduação em Farmácia  
João Pessoa – PB

### **Indyra Alencar Duarte Figueiredo**

Universidade Federal da Paraíba, Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde  
João Pessoa – PB

### **Sarah Rebeca Dantas Ferreira**

Universidade Federal da Paraíba, Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde  
João Pessoa – PB

### **Otemberg Souza Chaves**

Universidade Federal da Paraíba, Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde.  
João Pessoa – PB

### **Micaelly da Silva Oliveira**

Universidade Federal da Paraíba, Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde  
João Pessoa – PB

### **Maria de Fátima Vanderlei de Souza**

Universidade Federal da Paraíba, Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde  
João Pessoa – PB

### **Fabiana de Andrade Cavalcante**

Universidade Federal da Paraíba, Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde  
João Pessoa – PB

**RESUMO:** *Sida rhombifolia* (Malvaceae), conhecida popularmente por “guanxuma”, “mata-pasto” e “relógio”, é amplamente utilizada no Brasil para tratar reumatismo e diarreia. Assim, objetivou-se investigar os efeitos tóxico, antidiarreico e antiespasmódico do extrato etanólico bruto obtido das partes aéreas de *Sida rhombifolia* (SR-EtOH<sub>PA</sub>) em roedores. Foram realizadas as avaliações comportamental e toxicológica aguda (n=6), investigação da atividade antidiarreica (n=6) e do efeito antiespasmódico do SR-EtOH<sub>PA</sub> (n=5). Todos os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPB (Certidão 045/16). Dessa forma, no ensaio de toxicidade aguda, o SREtOH<sub>PA</sub> (2000 mg/kg, vo) não induziu sinais de toxicidade em camundongos fêmeas. O SR-EtOH<sub>PA</sub> apresentou efeito antidiarreico em camundongos por inibir as fezes líquidas

( $E_{max}=90,0\pm 12,6\%$  e  $DE_{50}=29,4\pm 15,6$  mg/kg). Diferentemente, o SR-EtOH<sub>PA</sub> (500 mg/kg) não alterou a secreção de fluido intestinal, porém inibiu com baixa eficácia o trânsito intestinal normal ( $E_{max}=21,7\pm 13,7\%$ ). Entretanto, o extrato inibiu o trânsito intestinal induzido por óleo de rícino ( $E_{max}=94,0\pm 9,0\%$  e  $DE_{50}=43,0\pm 16,0$  mg/kg) com maior eficácia. Além disso, em íleo isolado de rato, o SREtOH<sub>PA</sub> inibiu de maneira dependente de concentração e equipotente as contrações fásicas induzidas tanto por KCl ( $E_{max}=98,3\pm 1,7\%$  e  $CI_{50}=114,7\pm 8,1$  µg/mL) como por carbachol ( $E_{max}=100\%$  e  $CI_{50}=101,2\pm 11,8$  µg/mL). Com isso, pode-se concluir que o SREtOH<sub>PA</sub> apresenta baixa toxicidade e efeito antidiarreico em camundongos, sendo este por diminuir o trânsito intestinal, demonstrando potencial utilização medicinal para diarreia. Além disso, sugere-se que seu efeito antiespasmódico em íleo de rato ocorre por inibição do influxo de cálcio através de canais de cálcio dependentes de voltagem.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Sida rhombifolia* Linn., antidiarreica, antiespasmódica.

**ABSTRACT:** *Sida rhombifolia* (Malvaceae), popularly known as “guanxuma”, “mata-pasto” and “relógio”, is widely used in Brazil to treat rheumatism and diarrhea. The objective of this study was to investigate the toxic, antidiarrheal and antispasmodic effects of the crude ethanolic extract obtained from the aerial parts of *Sida rhombifolia* (SR-EtOH<sub>AP</sub>) in rodents. Acute behavioral and toxicological evaluation (n=6), investigation of antidiarrheal activity (n=6) and antispasmodic effect of the SR-EtOH<sub>AP</sub> (n=5) were performed. All protocols were approved by the Ethics Committee on Animal Use of the UFPB (Certificate 045/16). It was observed that SR-EtOH<sub>AP</sub> (2000 mg/kg, vo) did not induce signs of toxicity, nor death of the evaluated mice. SR-EtOH<sub>AP</sub> showed antidiarrheal effect in mice by inhibiting liquid feces ( $E_{max}=90.0\pm 12.6\%$  and  $ED_{50}=29.4\pm 15.6$  mg/kg). Differently, SR-EtOH<sub>AP</sub> (500 mg/kg) did not alter intestinal fluid secretion, but inhibited normal intestinal transit ( $E_{max}=21.7\pm 13.7\%$ ) with low efficacy. However, the extract inhibited intestinal transit induced by castor oil ( $E_{max}=94.0\pm 9.0\%$  and  $ED_{50}=43.0\pm 16.0$  mg/kg) with greater efficacy. In addition, in rat isolated ileum, the SR-EtOH<sub>AP</sub> inhibited in concentration-dependent and equipotent manner the phasic contractions induced by both KCl ( $E_{max}=98.3\pm 1.7\%$  and  $IC_{50}=114.7\pm 8.1$  µg/mL) and carbachol ( $E_{max}=100\%$  and  $IC_{50}=101.2\pm 11.8$  µg/mL). Thus, it can be concluded that SR-EtOH<sub>AP</sub> has low toxicity in mice. It has antidiarrheal effect by reducing the intestinal transit, demonstrating potential medicinal use in diarrhea. In addition, its antispasmodic effect on rat ileum is probably due to inhibition calcium influx through voltage-dependent calcium channels.

**KEYWORDS:** *Sida rhombifolia* Linn., antidiarrheal, antispasmodic.

## 1 | INTRODUÇÃO

Os produtos naturais historicamente desempenham um papel importante na farmacologia, sendo utilizados tanto para produção de derivados, bem como na síntese de novos fármacos a partir de protótipos moleculares de substâncias isoladas desses produtos, sendo essenciais na terapêutica (KINGSTON, 2010). Ademais, as drogas



de origem vegetal têm ampla aceitação na população mundial, sendo muito utilizadas na profilaxia, cura e como adjuvante no tratamento de doenças (FIRMO et al., 2011).

As plantas pertencentes à família Malvaceae possuem ampla distribuição nas regiões tropicais do mundo, sendo identificados cerca de 250 gêneros e 4.225 espécies. Outrossim, no Brasil, há uma variedade muito grande de espécies dessa família, no qual foram identificados 70 gêneros, sendo 9 endêmicos, num total de 765 espécies (STEVENS, 2003; COSTA et al., 2007). Já foram relatados efeitos anti-inflamatórios (*Malva sylvestris*), anticancerígeno (*Ecballium elaterium*) e laxante (*Verbena officinalis*) para várias espécies dessa família (PINHEIRO, 2016). O gênero *Sida* é o segundo mais abundante desta família, com 250 espécies distribuídas nas regiões tropicais (STEVENS, 2003).

A espécie de *Sida rhombifolia* Linn é conhecida popularmente como “guanxuma”, “mato-pasto” e/ou “relógio”, consiste em um subarbusto ereto de até 1,5 m de altura, que possui característica peculiar de desenvolver-se em solos pouco férteis e ácidos. Isto, por sua vez, pode explicar sua ampla distribuição no nordeste brasileiro (KISSMANN; GROTH, 2000). Na Figura 1, podem-se observar as imagens da espécie e as características de suas folhas e flores. Para essa espécie, já foram relatadas atividades larvicida (ISLAM et al., 2003), antiartrítica (GUPTA; NIRMAL; PATIL, 2009), hipoglicemiante (DHALWAL et al., 2010), antibacteriana (ASSAM et al., 2010), analgésica (KONATE et al., 2012), vasorrelaxante (CHAVES et al., 2013), anti-inflamatória (LOGESWARI et al., 2013), antioxidante (CHATURVEDI; KWATE; FULUKANI, 2015), e também existe comprovação de sua baixa toxicidade aguda e crônica em ratos (ANDRADE, 2016).



Figura 1 – Fotos da espécie de *Sida rhombifolia* Linn.

A) Subarbusto

B) Flores e folhas

Fonte: <http://www.fairfun.net/lepidoptera.butterflyhouse.com.au>

Dentre os constituintes químicos isolados desta espécie, destacam-se flavonoides, alcaloides, terpenoides e ácidos graxos (PINHEIRO, 2016). Vários metabólitos foram descritos, entre estes, estão 4 esteroides: sitosterol, estigmasterol, sitosterol-3-D-O-glicopiranosídeo, estigmasterol-3-D-O-glicopiranosídeo. Além destes, 4 porfirínicos: feofitina a, 17<sup>3</sup>-etoxi feoforbídeo a, 13-hidroxi feofitina b, 17<sup>3</sup>-etoxi feoforbídeo a. A



criptolepinona (alcaloide) e a 5,7- dehidroxi 4-metoxiflavona (flavonoide) também foram isolados a partir das partes aéreas (CHAVES, 2012). Todavia, segundo Pinheiro (2016), também foram isolados das partes aéreas ácidos graxos, como ácido palmítico (27,97%), ácido linoleico (26,81%) e ácido oleico (25,09%).

Em relação ao uso etnomedicinal para esta espécie, vale destacar o tratamento da gota (PINHEIRO, 2016) e desordens diarreicas (LORENZI; MATOS, 2008), bem relatadas na literatura.

Conceitualmente, a diarreia caracteriza-se por aumento do número de defecações (3 ou mais vezes) diárias, bem como pela consistência semissólidas e/ou líquidas das fezes, associadas frequentemente a dores abdominais (WHO, 2013). Além desse fato, geralmente a diarreia pode ser caracterizada como uma doença autolimitada, que em muitos casos podem ser evitados e tratados de forma rápida (FARTHING, 2000). Epidemiologicamente, as afecções diarreicas afetam principalmente crianças, abaixo dos cinco anos de idade, provocando em média, 1,9 milhões de mortes por ano, sendo desse total 78% nas regiões africanas e sudeste asiático, onde apresentam condições sanitárias precárias (WHO, 2017). Etiologicamente, esse processo patológico está relacionado a três fatores desencadeadores: componente inflamatório, contrátil e secretor. Então, buscam-se novas substâncias com atividade sobre estes três causadores da diarreia, como aquelas que interferem no processo contrátil do músculo liso intestinal, promovendo atividade espasmolítica.

Sabe-se que, fundamentalmente, a contração de qualquer músculo liso depende do gradiente de concentração do cálcio citosólico ( $[Ca^{2+}]_c$ ), quando há um aumento da  $[Ca^{2+}]_c$ , ocorre um estímulo para contração (CAMPBELL, 2015). Quando, por sua vez, isto ocorre em resposta à ligação de um agonista ao receptor, denomina-se acoplamento farmacomecânico. Em contrapartida, quando há uma alteração da voltagem basal da membrana, levando a uma abertura posterior de um canal de cálcio ( $Ca_v$ ), diz-se que houve um acoplamento eletromecânico (REMBOLD, 1996; FUKATA; AMANO; KAIBUCHI, 2001). Assim, substâncias que atuam em um ou mais pontos dessas fontes etiológicas, podem ser candidatos a futuros fármacos (CURRÒ, 2016).

Com isso, nesse presente trabalho, foram investigadas as atividades tóxica, antidiarreica e antiespasmódica do extrato etanólico bruto obtido das partes aéreas de *Sida rhombifolia* Linn. (SREtOH<sub>PA</sub>) em roedores, e assim, comparar com os referidos efeitos observados para o extrato obtido de suas raízes, fomentando futuras pesquisas clínicas para a confirmação do uso medicinal da espécie no tratamento da diarreia (KINGSTON, 2010).

## 2 | OBJETIVOS

### 2.1 Geral

- Contribuir com o estudo farmacológico da família Malvaceae, em particular, da espécie *Sida rhombifolia* L;

### 2.2 específicos

- Avaliar a toxicidade aguda do SR-EtOH<sub>PA</sub> em camundongos;
- Investigar o efeito do SR-EtOH<sub>PA</sub> em modelo diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos;
- Analisar o efeito do SR-EtOH<sub>PA</sub> sobre a secreção de fluido intestinal em camundongos;
- Avaliar o efeito do SR-EtOH<sub>PA</sub> sobre a motilidade intestinal normal e induzida por óleo de rícino em camundongos;
- Investigar um possível efeito antiespasmódico do SR-EtOH<sub>PA</sub> em íleo de rato.

## 3 | METODOLOGIA

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Droga teste

O material vegetal foi cedido pela Profa. Dra. Maria de Fátima Vanderlei do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

#### 3.1.2 Coleta do material vegetal

As partes aéreas de *Sida rhombifolia* Linn. foram coletadas na cidade de Santa Rita-PB, em setembro de 2008 e sua identificação botânica foi realizada pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra do Centro de Biotecnologia da UFPB. Uma excisata encontra-se no herbário Prof. Lauro Pires Xavier, Universidade Federal da Paraíba (UFPB) sob a numeração Agra 7045.

#### 3.1.3 Obtenção do extrato etanólico bruto

As partes aéreas de *Sida rhombifolia* L. foram desidratadas em estufa, com ar circulante, à temperatura de 40 °C durante 96 horas, sendo em seguida triturada em moinho mecânico, obtendo um total de 5,5 kg de pó. Em seguida, o mesmo foi macerado em álcool (etanol) a 95% por 72 horas para a extração dos constituintes

orgânicos. A solução extrativa foi concentrada em rotaevaporador a 40 °C, fornecendo 570,0 g do extrato etanólico bruto.

### 3.1.4 Animais

Para a realização dos protocolos experimentais eram utilizados camundongos swiss (*Mus musculus*) machos e fêmeas (25-33 g) e ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) com 250 a 300 g. Todos estes provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Instituto de Pesquisa de Fármacos e Medicamentos (IpeFarM)/UFPB.

### 3.1.5 Solução Nutritiva

Foi utilizada a solução nutritiva de Krebs Henseleit (PAUVERT, 2003): NaCl (118,0 mM), KCl (1,2 mM), MgSO<sub>4</sub> (1,18 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,18 mM), CaCl<sub>2</sub> (2,5 mM), glicose (1,1 mM) e NaHCO<sub>3</sub> (25,0 mM).

### 3.1.6 Preparação do extrato para os ensaios farmacológicos

O SR-EtOH<sub>PA</sub> era solubilizado em Cremophor® (3%) e diluído em água destilada até a concentração de 50 mg/mL (*in vivo*) ou 10 mg/mL (*in vitro*) (soluções-estoque), conservado a 0 °C. No momento da realização dos protocolos experimentais eram diluídas em água destilada de acordo com a necessidade de cada protocolo experimental. As doses e as concentrações eram utilizadas em múltiplos de 2 ou 3, respectivamente, sendo a dose máxima de 500 mg/kg e a concentração máxima 729 µg/mL. A concentração final de Cremophor® nas cubas nunca excedeu 0,01% (v/v), nessa concentração o Cremophor® é desprovido de efeito contrátil ou relaxante no órgão estudado, de acordo com dados obtidos anteriormente.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Triagem farmacológica comportamental e avaliação da toxicidade aguda do SR-EtOH<sub>PA</sub> em camundongos

Para avaliação da toxicidade aguda, seguiu-se a metodologia descrita no guia nº 423 da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD, 2001). Esta, por sua vez, foi realizada em duas etapas, cada uma utilizando 3 fêmeas. Inicialmente, após jejum de 4 horas, eram tratadas com SR-EtOH<sub>PA</sub> (dose única de 2000 mg/kg) por via oral (vo) ou salina 10 mg/kg com Cremophor® (controle negativo, vo). Neste protocolo, eram avaliados alguns parâmetros comportamentais, como agressividade, postura, reação à manipulação, aos movimentos e aparência externa, além de dificuldades de respiração, ulceração da córnea, relutância ao movimento, dentre outros (Adaptado de Almeida et al., 1999). Outrossim, os animais eram ainda

avaliados durante 14 dias com a finalidade de verificar se houve alguma morte e, assim, estimar a dose do extrato que mata 50% dos animais testados ( $DL_{50}$ ). Após a administração da SR-EtOH<sub>PA</sub>, a evolução do peso dos animais também foi avaliada antes do tratamento, além de 7 e 14 dias após o tratamento. Todo procedimento foi realizado em duas etapas, cada uma com 3 fêmeas.

### *3.2.2 Efeito do SR-EtOH<sub>PA</sub> sobre a diarreia induzida por óleo de rícino*

Os camundongos, em jejum de 12 horas, eram divididos em 3 grupos de 6 animais cada um. O primeiro grupo era tratado com 10 mL/kg de solução salina mais Cremophor<sup>®</sup>, vo (controle negativo), o grupo dois com 10 mL/kg de loperamida, vo (controle positivo), e o grupo três era tratado com várias doses de SR-EtOH<sub>PA</sub>, vo. Após 30 minutos dos tratamentos, era administrado 10 mL/kg de óleo de rícino vo, agente indutor da diarreia. Em seguida, os animais eram separados em caixas individualizadas com fundo branco, era também realizada a contagem do número de bolos fecais e observada a sua consistência por até 4 horas, classificando-os em sólidos ou líquidos (AWOUTERS et al., 1978). Os valores do efeito máximo ( $E_{max}$ ) e  $DE_{50}$  (dose necessária para produzir 50% de seu efeito máximo) foram expressos como a percentagem da média e o desvio-padrão dos seus valores individuais.

### *3.2.3 Efeito do SR-EtOH<sub>PA</sub> sobre o trânsito intestinal*

Os camundongos em jejum de 12 horas eram divididos em 3 grupos de 6 animais cada um e todos tratados vo, com 10 mL/kg de solução salina mais Cremophor<sup>®</sup> (controle negativo), 2 mg/kg de atropina (controle positivo) ou SREtOH<sub>PA</sub> (várias doses). Após 30 minutos, era administrado 10 mL/kg do marcador, carvão ativado (5%) suspenso em goma arábica (0,5%). Transcorridos mais 30 minutos os animais eram eutanasiados por deslocamento cervical. A cavidade abdominal era aberta e o intestino delgado removido. Era determinado o comprimento total do intestino delgado de cada animal e a distância percorrida pelo marcador na ausência (RAO et al., 1997) e na presença do óleo de rícino 30 minutos antes da administração do carvão ativado (HSU, 1982; AYE-THAN; KUKAMI; THA, 1989). Os resultados foram expressos como a percentagem da distância percorrida pelo marcador em relação ao comprimento total do intestino. Os valores de  $DE_{50}$  foram calculados por regressão não linear.

### *3.2.4 Efeito do SR-EtOH<sub>PA</sub> sobre o acúmulo de fluido intestinal induzido por óleo de rícino*

Os camundongos, após passarem por um período de jejum de 24 horas e livre acesso a água eram divididos em 3 grupos de 6 animais cada um e tratados com solução salina 10mg/kg mais Cremophor<sup>®</sup>, vo (controle negativo), 10 mg/kg de

loperamida, vo (controle positivo) e SR-EtOH<sub>PA</sub>, vo (várias doses). Após 30 minutos, eram administrados 2 mL de óleo de rícino por animal. Transcorridos 30 minutos da administração do óleo, os camundongos eram eutanasiados por deslocamento vertical, o intestino delgado de cada animal era removido cuidadosamente, impedindo que o vazamento do conteúdo, e assim foi imediatamente pesado. Os resultados foram expressos como  $(Pi/Pm) \times 1000$ , onde Pi é o peso do intestino delgado e Pm é o peso do animal, em gramas (DI CARLO et al., 1993; MEHMOODA; SIDDIQIA; GILANIA, 2011). Os valores de DE<sub>50</sub> foram calculados por regressão não linear.

### 3.2.5 Efeito do SR-EtOH<sub>PA</sub> frente às contrações fásicas induzidas por carbacol ou por KCl

Os ratos eram mantidos em jejum por um período de 12 horas, tendo acesso à água *ad libitum* antes do início dos experimentos. Após este período eram eutanasiados por decapitação com o auxílio de uma guilhotina. O abdômen era aberto e um segmento do íleo de aproximadamente 15 cm de comprimento era retirado e colocado em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Krebs Henseleit a 37 °C gaseificadas com carbogênio. O pH da solução nutritiva era ajustado para 7,4 com uma solução de HCl ou NaOH 1 M (DANIEL; KWAN; JANSSEN 2001).

Após cuidadosa dissecação, o segmento do íleo era seccionado em fragmentos de 2 a 3 cm de comprimento, suspensos individualmente em cubas de banho para órgãos isolados. Para estabilização da preparação, esta era mantida em repouso por 30 minutos antes do contato com qualquer agente, sob tensão de 1 g, efetuando neste período, a renovação da solução nutritiva da cuba a cada 15 minutos. Após o período de estabilização era induzida uma contração com 30 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. Após um período de 15 minutos duas contrações fásicas de magnitudes similares, com intervalo de 15 minutos entre ambas, eram obtidas com 10<sup>-6</sup> M de carbacol, para obtenção do controle. O SR-EtOH<sub>PA</sub> era incubado por 15 minutos em preparações diferentes e a inibição da resposta submáxima do CCh e KCl era avaliada por comparação das respostas antes (controle) e após a adição do SR-EtOH<sub>PA</sub> à cuba, sendo sua eficácia expressa como E<sub>max</sub>. Os valores de CI<sub>50</sub> (concentração do extrato que inibe 50% do efeito de um agonista) foram calculados por regressão não linear.

### 3.3 Análise estatística

Os resultados foram expressos como a percentagem da média e do desvio-padrão (experimentos *in vivo*) ou erro padrão da média (experimentos *in vitro*), e analisados estatisticamente empregando-se o teste “t” (não pareado) ou análise de variância (ANOVA) “one-way” seguido do pós-teste de Tukey. A hipótese nula foi rejeitada quando  $p < 0,05$ . Como parâmetro de eficácia foi usado o E<sub>max</sub> e de potência

a  $DE_{50}$  e a  $CI_{50}$  que foram calculadas por regressão não linear. Todos os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism<sup>o</sup> versão 5.01.

#### 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo pôde nos fornecer dados importantes para a confirmação da atividade terapêutica das partes aéreas de *Sida rhombifolia* Linn. promovendo assim futuros estudos para a confirmação do seu uso na medicina popular para o tratamento da diarreia. Além disso, este estudo apresentou dados importantes sobre o seu provável mecanismo de ação farmacológico.

Esta doença, por sua vez, tem sido um fator preocupante de mortalidade e morbidade de diversas crianças, abaixo dos 5 anos de idade, em países subdesenvolvidos, principalmente, tendo em vista as condições sanitárias mais precárias dos mesmos (PEREIRA; CABRAL, 2008). Finalmente, como a diarreia é uma doença mais prevalente e letal em regiões mais pobres (OMS, 2008) e como há uma maior acessibilidade destas populações aos produtos de origem natural, o estudo pôde corroborar com o uso medicinal da planta, estabelecendo bases científicas para tal.

A priori, foi realizada avaliação da toxicidade aguda do SR-EtOH<sub>PA</sub>, seguindo a OECD (*Organisation for Economic Cooperation and Development*), pelo fato desse método de avaliação toxicológica estimar uma dose letal utilizando menos animais. O protocolo, seguindo o guia n<sup>o</sup> 423 (OECD, 2001), foi realizado iniciando-se com a administração de SREtOH<sub>PA</sub> em camundongos fêmeas (n = 6) partindo da dose de 2000 mg/kg, tendo em vista que, na literatura há registros de baixa toxicidade aguda e/ou crônica do extrato em questão (LOGESWARI, 2012; KONATE, 2012).

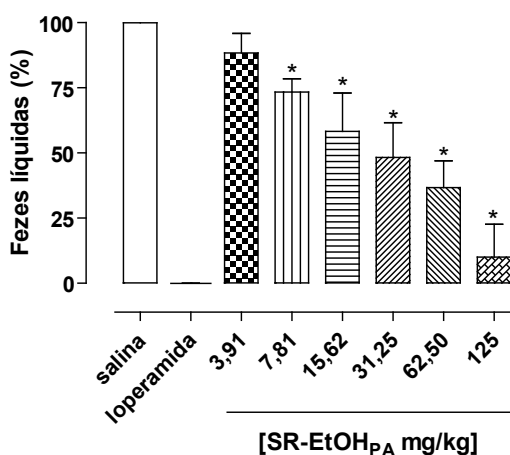
Não foi observada nenhuma alteração de ordem estimulante ou depressora do sistema nervoso central em 4 horas de observação. Em relação ao peso dos animais, não foi observado alteração entre os animais do grupo controle ( $30,0 \pm 2,0$  g) e do grupo que recebeu o SR-EtOH<sub>PA</sub> ( $30,7 \pm 1,4$  g), assim como não foi observada alteração do consumo de água e ração. Após a administração oral do SR-EtOH<sub>PA</sub> também não foi observado nenhuma morte durante os 14 dias de observação, estimando-se uma  $DL_{50}$  em torno de 5000 mg/kg, seguindo o preconizado (OECD, 2001). Assim, pode-se concluir que o SREtOH<sub>PA</sub> possui baixa toxicidade aguda nesse modelo experimental.

Resultados semelhantes foram descritos por Ranjan et al. (2011), que descreveram que na dose de 2000 mg/kg o extrato metanólico obtido das raízes de *Sida rhombifolia* também não apresentou sinais de toxicidade em ratos e camundongos. Além disso, Andrade (2016) descreveu que o extrato SR-EtOH<sub>PA</sub> na dose de 2000 mg/kg também não apresentou efeito tóxico em ratos. Fator importante desse dado toxicológico apresentado, uma vez que nos fornece uma segurança na utilização desse extrato para os demais protocolos experimentais *in vivo* utilizados nesse trabalho.



Sabendo-se que a diarreia pode ser causada por diversos fatores, dentre eles por uma desregulação contrátil e secretória do intestino delgado (LOGESWARI, 2012), investigou-se então se o extrato age em algum desses componentes. Tomando estas premissas, no experimento em questão, foi comprovada a sua atividade antidiarreica, tendo o SR-EtOH<sub>PA</sub> apresentado efeito antidiarreico de maneira dependente de dose ( $E_{max} = 90,0 \pm 12,6\%$  e  $DE_{50} = 29,4 \pm 15,6$  mg/kg) que, por sua vez, foi obtido na dose de 125 mg/kg (Gráfico 1). Comparado com os dados de Ranjan et al. (2011), o extrato metanólico obtido das raízes foi menos eficaz em inibir as fezes líquidas ( $E_{max} = 67,4\%$ ) alcançado na dose de 400 mg/kg.

Assim, isso permite fazer duas conclusões importantes. Inicialmente, o uso medicinal da espécie possuirá menor limitação, pois com a utilização das raízes poderia ocorrer um déficit no número de vegetais dessa espécie em longo prazo (EVANS et al., 2017). Assim, com a realização desse estudo, haverá maior incentivo ao seu uso etnomedicinal, tendo-se em vista que a obtenção das partes aéreas é menos danosa à espécie em estudo, além de otimizar sua obtenção. Ademais, pode-se sugerir que os metabólitos secundários identificados em comum nas raízes (RANJAN et al., 2011) e partes aéreas (PINHEIRO, 2016), provavelmente sejam os responsáveis por esse efeito antidiarreico.



**Gráfico 1** – Efeito antidiarreico do SR-EtOH<sub>PA</sub> em modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos.

As colunas e as barras verticais representam a percentagem da média e do dp, respectivamente (n = 6). ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Tukey; \* $p < 0,05$  e (salina vs. loperamida/SR-EtOH<sub>PA</sub>).

Como a diarreia pode ser causada por um aumento da secreção ou da motilidade, e o trato gastrintestinal exerce funções importantes na absorção dos nutrientes assim como no controle da quantidade de fluidos que entra e é absorvido para manutenção de uma boa saúde. A secreção de fluido é impulsionada pela secreção ativa de eletrólitos, sendo responsável por manter a fluidez do conteúdo intestinal durante várias fases na digestão (CLARKE, 2009). Diante disso, decidiu-se avaliar se o efeito antidiarreico do

SR-EtOH<sub>PA</sub> dar-se-ia por diminuição na secreção do fluido intestinal induzida por óleo de rícino, combatendo desta forma um dos principais agravamentos da diarreia.

Em relação ao fluido intestinal, Ranjan et al. (2011) descreveram uma atividade inibitória ( $E_{max} = 31,1\%$ ) do extrato obtido das raízes de *Sida rhombifolia* Linn. em camundongos. Diferentemente, em nossos resultados observou-se que o extrato obtido das partes aéreas SR-EtOH<sub>PA</sub> na dose de 500 mg/kg não apresentou efeito inibitório sobre o fluido intestinal induzido por óleo de rícino. Podendo-se concluir que essa diferença se deve ao fato das raízes conterem metabólitos secundários diferentes das partes aéreas.

Para investigar outro fator pelo qual o extrato promoveria seu efeito no quadro de diarreia, foram realizados protocolos de trânsito intestinal normal e induzido por óleo de rícino. Naqueles, foi verificado que o extrato exerce um efeito antidiarreico por diminuir o trânsito intestinal induzido (quadro patológico) sem alterar, substancialmente, o trânsito normal (quadro homeostático). Assim, o SREtOH<sub>PA</sub> apresentou efeito inibitório do trânsito intestinal normal, tendo o mesmo mostrado efeito máximo inibitório de apenas  $21,7 \pm 13,7\%$  na dose de 250 mg/kg. Importante salientar que, na dose máxima (500 mg/kg) não houve inibição do trânsito intestinal normal. Por sua vez, o SREtOH<sub>PA</sub> no protocolo de trânsito induzido por óleo de rícino, obteve efeito inibitório de maneira dependente de dose ( $E_{max} = 94,0 \pm 9,0\%$  e  $DE_{50} = 43,0 \pm 16,0$  mg/kg) alcançado na dose de 250 mg/kg do extrato (Gráfico. 2).

Semelhante aos dados de diarreia induzida por óleo de rícino, o extrato metanólico obtido das raízes foi menos eficaz em inibir o trânsito intestinal ( $E_{max} = 61,9\%$ ) alcançado na dose de 400 mg/kg (RANJAN et al., 2011).

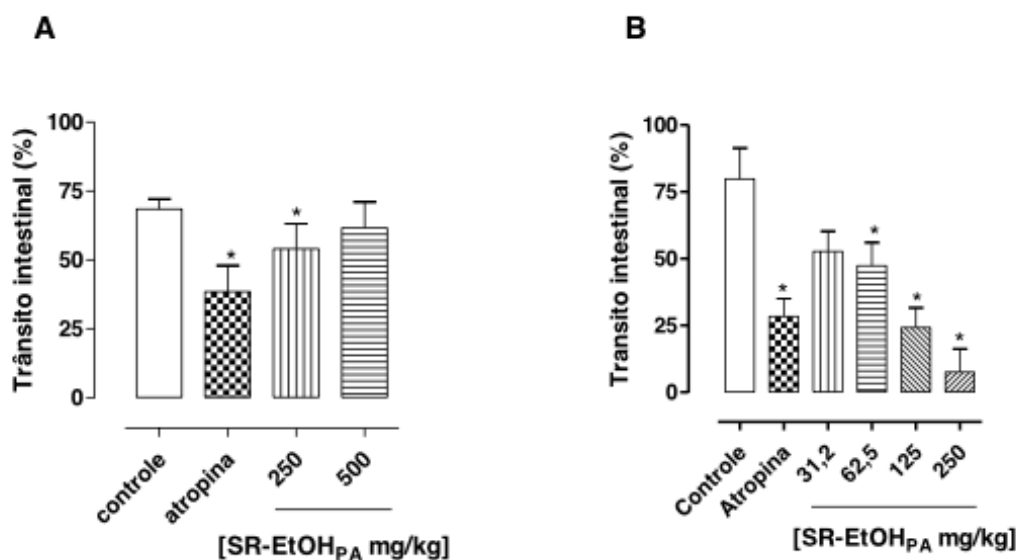


Gráfico 2 – Efeito inibitório desse extrato em modelo de trânsito intestinal normal e induzido em camundongos.

**A:** Porcentagem de trânsito intestinal normal. **B:** Porcentagem de trânsito induzido. As colunas e as barras verticais representam a percentagem da média e o dp, respectivamente (n = 6). ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Tukey; \* $p < 0,05$  e (salina vs. atropina/SR-EtOH<sub>PA</sub>).

Assim, pode-se aferir que o extrato somente possui efeito em um quadro diarreico, o que por sua vez é benéfico ao paciente, não causando efeito adverso de constipação, caso seja a espécie utilizada para outros fins medicinais (TEIXEIRA, 2013). Isso, contudo, pode ser afirmado, pois o efeito do extrato sobre o trânsito normal foi verificado na dose de 250 mg/kg (Gráfico 2), esta por sua vez, supera à do efeito máximo encontrado no protocolo de atividade antidiarreica, que foi de 125 mg/kg (Gráfico 1).

Baseado no fato de que o SR-EtOH<sub>PA</sub> apresentou atividade sobre a motilidade intestinal, investigou-se se o mesmo teria atividade sobre íleo de rato, pois o músculo liso intestinal é considerado um modelo importante na investigação do mecanismo de ação de algumas substâncias para uma possível utilização em processos fisiopatológicos, como diarreia e cólicas intestinais (KIM et al., 2008).

Para confirmar a ação do SR-EtOH<sub>PA</sub> na contratilidade intestinal, foi realizado experimento *in vitro*, no qual verificou-se que o extrato inibiu de maneira dependente de concentração tanto as contrações induzidas por 30 mM de KCl ( $CI_{50} = 114,7 \pm 8,1 \mu\text{g/mL}$ ), através do acoplamento eletromecânico (REMBOLD, 1996), como por  $10^{-6}$  M de carbacol ( $CI_{50} = 101,2 \pm 11,8 \mu\text{g/mL}$ ), um éster de colina que apresenta atividade muscarínica, sendo esta pela ligação ao receptor  $M_3$  (acoplamento misto) no músculo liso intestinal (FUKATA; AMANO; KAIBUCHI, 2001). O efeito máximo do SR-EtOH<sub>PA</sub> foi atingido na concentração de  $729 \mu\text{g/mL}$  tanto frente ao KCl ( $E_{\text{max}} = 98,3 \pm 1,7\%$ ) quanto ao CCh ( $E_{\text{max}} = 100\%$ ). Assim, provavelmente, o extrato tem sua ação antiespasmódica por atuar em um passo comum das vias contráteis dos dois agentes em questão, sendo este passo, possivelmente, a inibição do influxo de cálcio através dos canais de cálcio voltagem-dependente ( $Ca_v$ ). Contudo, para a confirmação do mecanismo de ação do extrato, dever-se-á realizar protocolos mais específicos.

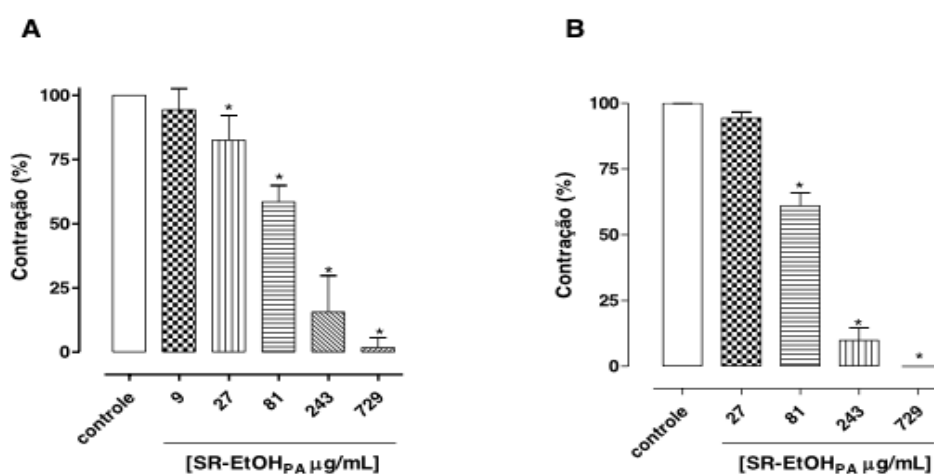


Gráfico 3 – Efeito espasmolítico do SR-EtOH<sub>PA</sub> frente às contrações fásicas induzidas por 30 mM de KCl (A) e por  $10^6$  M de carbacol (B) em íleo de rato.

As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5). ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Tukey. \* $p < 0,05$  (controle vs. SR-EtOH<sub>PA</sub>).

A responsividade do íleo de rato aos agentes contráteis foi restabelecida em  $45 \pm 15$  minutos para o KCl e de  $30 \pm 15$  minutos para o CCh após a retirada do extrato ( $729 \mu\text{g/mL}$ ) da cuba.

## 5 | CONCLUSÕES

Na avaliação e comparação do efeito do extrato obtido das folhas de *Sida rhombifolia* sobre a musculatura lisa intestinal em roedores, pode-se concluir que o SREtOH<sub>PA</sub>:

- Não induziu sinais de toxicidade aguda em camundongos nas condições avaliadas, apresentando, assim, uma baixa toxicidade;
- Apresentou efeito antidiarreico por diminuição do trânsito intestinal induzido por óleo de rícino, demonstrando uma potencial utilização medicinal da espécie em doenças intestinais, como a diarreia;
- Apresentou efeito antiespasmódico em íleo de rato, provavelmente, por inibição do influxo de cálcio através dos canais de cálcio dependentes de voltagem;
- Foi mais eficaz que o extrato obtido das raízes de *Sida rhombifolia*.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, C. E. et al. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. *Revista de Saúde Pública*, v. 29, n. 6, p. 428-433, 1995.

ANDRADE, R. S. Avaliação da toxicidade não-clínica do extrato etanólico bruto e frações de *Sida rhombifolia* Linn. em roedores. In: **Encontro Nacional de Iniciação Científica**, João Pessoa-PB. 2016.

ASSAM, J. P. et al. *In vitro* antibacterial activity and acute toxicity studies of aqueous metanol extract os *Sida rhombifolia* Linn. (Malvaceae). **Complementary and Alternative Medicine**. v.10, p. 2-7, 2010.

AWOUTERS, F. et al. Delay of castor oil diarrhoea in rats: a new way to evaluate inhibitors of prostaglandin biosynthesis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 30, n. 1, p. 41-45, 1978.

AYE-THAN, J. H.; KUKAMI, W.; THA, S. J. Antidiarrhoeal efficacy of some Burmese indigenous drug formulations in experimental diarrhoea test models. **Journal of Crude Drug Research**, v. 27, p. 195-200, 1989.

CAMPBELL, L. I. Gut motility and its control. **Anesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 16, p. 40-42, 2015.

CARLO, D. G. et al. Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: structure-activity relationships. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 45, n. 12, p. 1054-1059, 1993.

CHATURVEDI, P.; KWARE, T. E.; FULUKANE, I. Evaluation of free radical scavenging activities of *Sida rhombifolia* extracts. **Indian Journal of Plant Sciences**. v. 4, p. 5-10, 2015.

CHAVES, O. S. et al. Secondary metabolites from *Sida rhombifolia* L. (Malvaceae) and the vasorelaxant activity of cryptolepinone. **Molecules**. v. 18, p. 2769-2777, 2013.

CLARKE L. L. A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine. **American Journal Physiology-Gastrointestinal Liver Physiology**, v. 296, p. 1151–1166, 2009.

COSTA, D. A. et al. Chemical constituents from *Bakeridesia pickelii* monteiro (Malvaceae) and the relaxant activity of kaempferol 3-O-Beta-(6 E-p-coumaroyl) glycopyranoside on ginea-pig ileum, **Química Nova**, v.30, n.4, p. 901-903, 2007.

CURRÒ, D. The modulation of potassium channels in the smooth muscle as a therapeutic strategy for disorders of the gastrointestinal tract. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**. v.104, p. 263-305, 2016.

DANIEL, E.; KWAN, C. Y.; JANSSEN, L. Pharmacological techniques for the *in vitro* study of intestinal smooth muscle. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 45, p. 141–158, 2001.

DHALWAL, K. et al. Hypoglycemic and hypolipodemic effect of *Sida rhombifolia* spp. Retura in Diabetic Induce Animals. **International Journal of Phytomedicine**. v. 2, p. 160-165, 2010.

DI CARLO, G. et al. Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: structure-activity relationships. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 45, n. 12, p. 1054-1059, 1993.

EVANS, P. M. et al. Thresholds of biodiversity and ecosystem function in a forest ecosystem undergoing dieback. **Scientific Reports**, v. 7, p.1-9, 2017.

FARTHING, M. J. Diarrhoea: a significant worldwide problem. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 14, p. 65-69, 2000.

FARTHING, M. et al. Diarreia aguda em adultos e crianças: uma perspectiva mundial. **World Gastroenterology Organisation**. v. 1. p. 1-25, 2012.

FIRMO, W. C. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, p. 90-95, 2011.

FUKATA, Y.; AMANO, M.; KAIBUCHI, K. Rho–Kaibuchi, K-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, p. 32-39, 2001.

GUPTA, S. R.; NIRMAL, S. A.; PATIL, R. Y. Antiarthritic action of polar fraction from *Sida rhombifolia* aerial parts. **Oriental Pharmacy and Experimental Medicine**, v. 9, p. 335-338, 2009.

HSU, W. H. Xylazine induced delay of small intestinal transit in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 83, p. 55–60, 1982.

ISLAM, M. E. et al. Larvicidal activity of a new glucoside, phenyl ethyl  $\beta$ -D-glucopyranoside from the stem os the plant *Sida rhombifolia*. **Pankistan Journal of Biological Sciences**, v.6, p. 73-75, 2003.

KINGSTON, D. G. I. Modern Natural Products Drug Discovery and its Relevance to Biodiversity Conservation. **Journal of Natural Products**, v. 3, p. 496-511, 2010.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**, São Paulo. BASF, 2000.

KONATE, K. et al. Preliminary toxicity study, anti-nociceptive and anti-inflammatory properties of extracts from *Sida rhombifolia* L. (Malvaceae). **International Journal of Phamaceutic Sciences and**

**Reserch**, v. 3. p. 3136-3145, 2012.

LOGESWARI, P. et al. **International Journal of Sciences Pharmaceutical and Research**, v. 4, p. 316-321, 2013.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. H.; Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2. ed. Nova Odessa: **Instituto Platarum**, 2008.

OECD. Acute Oral Toxicity. Acut Toxic Class Method. **OECD guideline for testing of chemicals**, nº 423, 2001.

OMS. Safer water, better health. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241596435\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241596435_eng.pdf)>. Acesso em 27 de março de 2015. 2008.

PEREIRA, V. V.; CABRAL, I. E. Diarréia aguda em crianças menores de um ano: subsídios para o delineamento do cuidar. **Escola Anna Nery Revista de Enfermagem**, v. 12, p. 224-229, 2008.

PINHEIRO, A. A. Contribuição do conhecimento fitoquímico de *Sida rhombifolia* e avaliação da atividade antimicrobiana do seu óleo essencial. **Dissertação Programa de pós-graduação em produtos naturais e biossintéticos ativos da Universidade Federal da Paraíba**, p.27, 2016.

RANJAN, R. S.; SHANKAR, M. U.; KUMAR, P. S.; SAIPRASANNA, B. Avaluation os antidiarhoeal activity of *Sida rhombifolia* Linn. root. **International Research Journal of Pharmacy**. v. 2, p. 159-160, 2011.

REMBOLD, C. M. Electromechanical and pharmacomechanical coupling. In: Bárány; M. **Biochemistry of Smooth Contraction**. San Diego, Academic Press, p. 227-239, 1996.

STEVENS, F. Angiosperm Phylogenic, website. Version 4, Mayo 2003, (<http://www.mobot.mobot.org>).

TEIXEIRA, M Z. Efeito rebote dos fármacos modernos: evento adverso grave desconhecido pelos profissionais da saúde. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 59. p. 629–638, 2013.



## INVESTIGAÇÃO DE LECTINA E INIBIDOR DE TRIPSINA EM TUBÉRCULOS DE INHAME (*Dioscorea alata*) CULTIVADO NO NORDESTE DO BRASIL

### **Julia Mariano Caju de Oliveira**

Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Nutrição João Pessoa – Paraíba

### **Edilza Silva do Nascimento**

Instituto Federal de Ciência e Tecnologia Baiano Governador Mangabeira – Bahia

### **Tatiane Santi Gadelha**

Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Biologia Molecular João Pessoa – Paraíba

### **Carlos Alberto de Almeida Gadelha**

Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Biologia Molecular João Pessoa – Paraíba

**RESUMO:** O inhame é um tubérculo da família *Dioscoreaceae*, pertencente ao gênero *Dioscorea*. Dentre as espécies mais cultivadas no Brasil encontra-se o *Dioscorea alata*. É rico em carboidratos, com baixo teor lipídico e possui teor considerável de proteínas, minerais e vitaminas. Além dos nutrientes, os tubérculos podem apresentar fatores antinutricionais os quais são compostos proteicos que quando consumidos, interferem na digestão e absorção dos nutrientes. São exemplos destes os inibidores de tripsina (ITs) e lectinas. O objetivo deste estudo foi investigar a presença de lectinas e ITs no inhame (*Dioscorea alata*) cultivado no nordeste brasileiro. Para isso, foi realizada a extração, fracionamento pela solubilidade e determinação do teor de proteínas solúveis.

Em seguida determinou-se a presença de ITs e lectinas nos extratos bruto (EB) e nas frações, cujo perfil eletroforético, realizado por SDS-PAGE, atividade antibacteriana e antioxidante foram avaliados. A extração em água pH 9,0 apresentou maior teor de proteína solúvel. Para a atividade anti-triptica, a fração globulina ácida apresentou inibição enzimática. No ensaio de atividade hemaglutinante, foi detectada a lectina em 4 extratos. O perfil eletroforético apresentou proteínas com pesos moleculares variando de 24 kDa a 150 kDa, principalmente a dioscorina com cerca de 31 kDa. Quanto à atividade antioxidante, a fração glutelina básica mostrou maior atividade no método ABTS, já no método DPPH, prevaleceu os extratos solúveis em água. Com base nestas potenciais atividades biológicas, seu uso como alimento terapêutico deve ser melhor explorado.

**PALAVRAS-CHAVE:** inhame, proteína, antioxidante, atividade anti-triptica, lectina.

**ABSTRACT:** The yam is a tuber of the *Dioscoreaceae* family, from the *Dioscorea* genus. One of the most cultivated species in Brazil is the *Dioscorea alata*. It is rich in carbohydrates, with a low lipid content and a considerable protein content, minerals and vitamins. Beyond nutrients, the tubers may present antinutritional factors which are protein compounds that when consumed can interfere with nutrients digestion

and absorption. Some examples are trypsin inhibitors (TIs) and lectins. The objective of this study is to investigate the presence of lectins and TIs in yam (*Dioscorea alata*) cultivated in Brazil. Therefore, the protein was extracted, fractionated by solubility and determined its soluble content. Then the presence of TIs and lectins in the crude extracts (CE) and in the fractions were determined, and its electrophoretic profile, by SDS-PAGE, antibacterial and antioxidant activity were evaluated. The extraction in water pH 9.0 presented higher soluble protein content. For the anti-trypsin activity, the acid globulin fraction showed enzymatic inhibition. In the hemagglutinating activity assay, the presence of lectin in 4 extracts was detected. The electrophoretic profile presented proteins with molecular weights varying from 24 kDa to 150 kDa, mainly the dioscorin around 31 kDa. As for the antioxidant activity, the basic glutelin presented greater activity in the ABTS method, while in the DPPH method, the extracts in water prevailed. In view of those potential biological activities, its use as a therapeutic food should be better explored.

**KEYWORDS:** yam, protein, antioxidant, anti-trypsin activity, lectin.

## 1 | INTRODUÇÃO

### 1.1 Inhame (*Dioscorea* sp.)

O inhame é um tubérculo da família *Dioscoreaceae*, pertencente ao gênero *Dioscorea*, apresentando cerca de 600 espécies, entre as quais as mais relevantes são as que apresentam túberas (órgão de reserva da planta) comestíveis, sendo algumas delas: *Dioscorea cayennensis*, *D. rotundata*, *D. alata*, *D. trifida* e *D. esculenta* (PAULA, 2012; HEREDIA, 2000; SANTOS, 2007).

É cultivado e consumido mundialmente, principalmente em regiões de clima tropical, sendo originário do sudeste da Ásia (*D. alata*), África Ocidental (*D. cayennensis* e *D. rotundata*) e América do Sul e Central (*D. trifida*), onde o continente africano se destaca como maior produtor mundial (ALEXANDER, 1969; FAOSTAT, 2014).

Tanto no Brasil como mundialmente, a produção de inhame vem crescendo ao longo dos anos, sendo o segundo maior produtor da América do Sul (FAOSTAT, 2014). No Brasil a produção e comercialização visam principalmente o consumo interno, sendo a maior parte na região Nordeste (MENDES, 2013).

O elevado consumo de inhame no Nordeste brasileiro está relacionado à tradição da culinária local, sendo um ingrediente típico da região e presente na alimentação de todas as classes sociais, além servir como fonte de renda e emprego para a atividade agrícola local, predominantemente na agricultura familiar (MENDES, 2013). O Estado da Paraíba é um dos maiores produtores de inhame à nível da região Nordeste, junto a Pernambuco, Alagoas, Bahia e Maranhão (IBGE, 2010).

Em relação a sua composição como alimento, o inhame é rico em carboidratos (em sua maioria o amido), possui um teor considerável de proteínas, baixo teor de lipídeos

e apresenta minerais como fósforo, cálcio, ferro e vitaminas B1 e B2 (ABRAMO, 1990; ANUÁRIO, 1994). A principal proteína presente no inhame é a dioscorina, que exerce a função de proteína de armazenamento, provendo reservas de nitrogênio, carbono e enxofre, necessárias para o desenvolvimento da planta (SHEWRY, 1995). A dioscorina vem sendo estudada devido ao seu potencial como composto bioativo, pois apresenta diferentes atividades, dentre as quais, a capacidade antioxidante (HOU, 2001).

De acordo com Bhandari (2003), o inhame também é fonte de diversos compostos que apresentam propriedades bioativas, como os ácidos orgânicos e os polifenóis. Os ácidos orgânicos no alimento influenciam no seu sabor, aceitabilidade, estabilidade, enquanto os compostos fenólicos apresentam diversas atividades tais como antioxidante, antitumoral, antimutagênica e antibacteriana (POYRAZOGLU, 2002; SHUI, 2002).

Entre as espécies mais cultivadas, destaca-se a *Dioscorea alata*, que apresenta grande importância comercial, sendo uma das mais consumidas *in natura*, juntamente com *Dioscorea cayennensis* e *Dioscorea rotundata* (PAULA, 2012).

## 1.2 Fatores Antinutricionais

Os fatores antinutricionais são compostos, ou classes de compostos, presentes em diversos alimentos, principalmente nos de origem vegetal, como leguminosas e cereais, e também em outros diversos organismos, sendo amplamente encontradas na natureza. Quando consumidos, esses compostos exercem uma diminuição no valor nutricional do alimento, por interferirem na digestão, absorção e utilização dos nutrientes (SOETAN & OYEWOLE, 2009). Dentre esses compostos encontram-se os inibidores de proteases, fitatos, taninos, oxalatos e lectinas (NIKMARAM, 2017).

### 1.2.1 Lectinas

As lectinas foram identificadas em vegetais pela primeira vez no ano de 1888 quando Hermann Stillmark observou a ricina, fator tóxico presente nos extratos da mamona (*Ricinus communis*) responsável pela aglutinação de hemácias no sangue de animais (SHARON e LIS, 1988). Em seguida foram descobertas proteínas capazes de aglutinar hemácias em outros vegetais e organismos.

Posteriormente, foi utilizado o termo lectinas para identificar algumas dessas proteínas hemaglutinantes que eram seletivas para certos grupos sanguíneos humanos (PEUMANS, 1995). Por fim, lectinas foram definidas como proteínas estruturalmente heterogêneas, não pertencentes ao sistema imunológico, que possuem a capacidade de ligar-se reversivelmente e com alta especificidade a carboidratos, ao reconhecerem os sítios específicos dessas moléculas, porém sem alterar a sua estrutura e suas ligações (PEUMANS e VAN DAMME, 1995; 1998).

Estudos têm comprovado a presença de lectinas em espécies de *Dioscorea*,

conforme demonstrado por Gaidamashvili et al. (2004), que observaram atividade lectínica em 3 proteínas isoladas de *D. batatas*. Tais lectinas mostraram atividade para seleção celular e isolamento de glicoproteínas (LU, 2012).

### 1.2.2 Inibidores de proteases

Os inibidores de proteases (IPs) são fatores antinutricionais de grande importância, tendo como principal função a inativação de certas enzimas, seja desacelerando ou inibindo totalmente a sua ação (NIKMARAM, 2012). Os IPs interagem com as enzimas proteolíticas durante a digestão, impedindo uma total absorção das proteínas alimentares, causando sua excreção e diminuindo a biodisponibilidade dessas proteínas para o organismo.

Os IPs estão presentes principalmente em leguminosas e cereais, sendo o inibidor de tripsina um dos mais relevantes. Quando presente nos alimentos durante a ingestão, os inibidores de tripsina interferem na digestão de proteínas, podendo causar distúrbios no metabolismo de certos nutrientes (ADEYEMO & ONILUDE, 2013).

No gênero *Dioscorea* spp, estudos comprovam a presença de atividade de IPs em dioscorinas purificadas dos tubérculos das espécies *D. batatas*, *D. alata* e *D. pseudo japonica* (HOU et al., 1999; 2000). Dessa forma, o objetivo deste estudo foi investigar a presença de lectinas e inibidores de tripsina no inhame (*Dioscorea alata*) cultivado no nordeste brasileiro.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Proteômica Estrutural (LaProtE) e Laboratório de Bioquímica, Genética e Radiologia (BioGeR-LAB), localizados no Departamento de Biologia Molecular (DBM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

### 2.1 Matéria-prima e preparo da amostra

A matéria-prima foi adquirida no comércio da cidade de João Pessoa, Paraíba. Os inhames foram primeiramente higienizados, lavados com água corrente e em seguida imersos em água clorada a 200ppm, durante 15 minutos e, finalmente, lavados com água destilada. Após secos à sombra, os tubérculos foram devidamente embalados e mantidos congelados até sua utilização.

Para a preparação da farinha, os inhames foram descongelados, descascados e cortados em pequenos pedaços para serem triturados em liquidificador junto com água destilada. Após o processo de trituração, obteve-se uma massa, a qual foi passada por três vezes em uma malha fina de poliéster para garantir a retirada total da mucilagem (FONSECA, 2006).

Em seguida, para retirada dos compostos fenólicos, a massa foi imersa em etanol

a 70% overnight, em refrigeração. A massa resultante foi centrifugada a 4856G por 10 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, o precipitado obtido foi colocado à sombra, para evaporar o resíduo de etanol. A massa seca foi então triturada em moinho, obtendo-se uma farinha fina, armazenada sob refrigeração e usada nas análises posteriores.

## 2.2 Extração de proteínas solúveis

A farinha fina teve suas proteínas extraídas em diferentes soluções extratoras (água; água pH 9,0; Glicina 0,1M NaCl 0,15M pH 2,6; Glicina 0,1M NaCl 0,15M pH 9,0; NaCl 0,5M e Tris-HCl 0,1M pH 7,6). Assim, a farinha foi dissolvida nas soluções, na proporção de 1:10, sendo mantida em agitação por 3 horas, seguida de centrifugação a 4856G por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, coletou-se o sobrenadante denominado de extrato bruto (EB).

## 2.3 Fracionamento proteico

A farinha fina de tubérculos de *D. alata* também foi submetida ao fracionamento proteico pela solubilidade de Osborne (1924), obtendo-se as frações albumina, globulina, prolamina, glutelina ácida e básica, de acordo com a metodologia descrita por Osborne (1924). Para a extração da primeira fração utilizou-se a proporção de 1:10 de farinha para solução de NaCl 0,5M, mantendo em agitação constante por 4 horas e em seguida centrifugado e separado o sobrenadante do resíduo. O sobrenadante foi então dialisado e centrifugado para obtenção da fração albumina. O precipitado dessa centrifugação foi ressuscitado com solução de NaCl 0,5M, obtendo no sobrenadante a fração globulina. O resíduo da primeira extração foi agitado com etanol 70% por 1 hora, para a obtenção da fração prolamina. Em seguida o resíduo foi ressuscitado com solução de HCl 0,1M e agitado por 1 hora, para extração da fração glutelina ácida e seu precipitado agitado em solução de NaOH 0,1M por 1 hora para obtenção da glutelina básica.

## 2.4 Determinação do teor de proteínas solúveis

A determinação do teor de proteínas solúveis no extrato bruto e nas frações foi realizada a partir do método de Bradford (1976), utilizando a albumina sérica bovina (BSA) para obtenção da curva padrão. A determinação foi feita a partir da diluição de 100  $\mu$ L da amostra em água destilada, nas proporções de 1:2 - 1:32. Em seguida, adicionou-se 2,5 mL do reagente de Bradford e após 10 minutos foi feita a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro UV/VIS em comprimento de onda a 595 nm.

## 2.5 Teste de tanino

A realização da verificação da presença de tanino nos extratos e frações foi feita de acordo com o método descrito por Mello et al. (2001) utilizando gelatina a 2,5%. Em 2 ml de extrato adicionou-se a solução de gelatina gota a gota e verificou-se a

formação de precipitado, indicando reação positiva para taninos.

## 2.6 Ensaio de atividade anti-tríptica

As amostras foram submetidas ao ensaio de atividade anti-tríptica para determinar a presença de inibidor de tripsina de acordo com o método descrito por Xavier-Filho et al. (1989). Primeiramente, foi feita a curva padrão utilizando diferentes concentrações da enzima tripsina para determinar a quantidade a ser utilizada no ensaio. A concentração de enzima que apresentou absorvância entre 0,200 a 0,300 em comprimento de onda de 410 nm foi utilizada para o ensaio.

O ensaio de atividade anti-tríptica foi realizado em banho de gelo, utilizando a quantidade de enzima determinada pela curva, 120  $\mu$ L de solução HCl 0,0025M, Tris-HCl 0,05M em quantidade determinada pela concentração da enzima, 100  $\mu$ L de cada amostra e 100  $\mu$ L do inibidor de tripsina, usado para controle positivo.

Em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C durante 10 minutos. Posteriormente, o substrato BAPNA foi adicionado ao ensaio e após 15 minutos de incubação, acrescentou-se 120  $\mu$ L de solução de ácido acético 30% para interromper a reação. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 410 nm, e em seguida calculou-se o percentual de inibição de cada amostra.

## 2.7 Ensaio de atividade hemaglutinante

Foi realizado o ensaio de atividade hemaglutinante para a detecção da presença de lectinas nos extratos e nas frações, pela metodologia descrita por Debray et al. (1981). Para esse ensaio, foram utilizadas hemácias de coelho tratadas a 3%. As amostras diluídas em solução de NaCl 0,15 M foram tamponadas em solução de Tris-HCl pH 7,4 e em seguida adicionado 100  $\mu$ L do sangue tratado. Em seguida, foram mantidas em estufa a 37°C e os resultados foram observados nos intervalos de 20 minutos, 4 horas, 8 horas e 24 horas, a fim de verificar a presença de hemaglutinação.

## 2.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A determinação do perfil de massas relativas das proteínas de tubérculos de *D. alata* foi feita por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970). O experimento foi realizado com o extrato bruto e frações concentradas, os quais foram diluídos em tampão de amostra e desnaturados por aquecimento. Para tanto, utilizou-se de um gel de separação de 15% e de concentração, 3,5%. A corrida foi realizada em 200V, 25 mA e 15W utilizando marcador de peso molecular da GE®. Após o término da corrida, o gel foi imerso em solução fixadora por 1 hora e em seguida corado com Comassie Brilliant Blue R-250 overnight. Após decorrido o tempo, o gel foi descorado em solução de ácido acético a 10% sob agitação por 6 horas.



## 2.9 Determinação da capacidade antioxidante total

A capacidade antioxidante das amostras foi avaliada pelo método de sequestro de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) utilizando uma solução de Trolox 2mM como padrão, conforme descrito por Brand-Williams, Cuvelier, Berset (1995). Na determinação, foram utilizadas 100  $\mu$ L de cada amostra e 750  $\mu$ L de uma solução 0,06M do radical DPPH. A mistura foi deixada por 85 minutos em agitação, e em seguida centrifugada a 4856G por 5 minutos e, finalmente, feito a leitura em espectrofotômetro a 517 nm.

A atividade antioxidante também foi determinada pelo método de captura do radical ABTS (RUFINO et al., 2007). O radical ABTS foi produzido a partir de 5mL da solução de ABTS mais 88 $\mu$ L da solução de persulfato de potássio, sendo mantido no escuro por 16 horas. Em seguida o radical foi diluído em álcool etílico P.A. até alcançar absorvância de 0,700  $\pm$  0,05nm a 734 nm. Assim como no método anterior, foi utilizado uma solução de Trolox 2mM como padrão, transferindo uma alíquota de 15  $\mu$ L da solução de trolox para tubos de ensaio contendo 1,5 mL da solução do radical ABTS. Após 6 minutos realizou-se a leitura a 734 nm.

## 2.10 Determinação da atividade antimicrobiana

Para determinação da atividade antimicrobiana das frações e extratos foram utilizadas bactérias dos gêneros *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. As amostras foram diluídas na proporção de 3mg/ml de água, ajustadas para pH 7,0 e filtradas para o ensaio. As bactérias foram submetidas à incubação a 37°C em meio Brain Heart Infusion (BHI) por no mínimo 11 horas antes do ensaio.

Foi aplicada 100 $\mu$ L de amostra na microplaca de 96 poços em diluição seriada em meio BHI e em seguida, aplicou-se 20 $\mu$ L da bactéria previamente diluída em água peptonada em cada poço, exceto no controle. Em seguida, foi encubada a 37°C em espectrofotômetro para leitura a 630 nm por 18 horas.

## 2.11 Análise estatística

Para analisar estatisticamente e gerar o gráfico da atividade antimicrobiana, foi utilizado o programa GraphPad Prism 6, e utilizou-se a ferramenta de teste T para avaliar a significância (<0,05) dos resultados.

# 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1 Determinação do teor de proteínas solúveis.

A partir do método de Bradford, foram quantificadas as proteínas solúveis de 6 extratos brutos e 5 frações a partir da farinha de tubérculos do inhame *D. alata*,

apresentados na Tabela 1; onde pode ser verificado que as extrações realizadas em água e água pH 9,0 resultaram em maiores concentrações de proteína solúvel.

Amostras	mg de proteína/mL de amostra
EB Água	1,1988
EB Água pH 9,0	1,2636
EB Glicina pH 2,6	0,0810
EB Glicina pH 9,0	0,8985
EB NaCl	0,6804
EB Tris-HCl pH 7,6	0,8942
Albumina	0,1058
Globulina	0,1188
Glutelina ácida	0,6971
Glutelina básica	0,3412
Prolamina	0,0475

Tabela 1: Quantificação do teor de proteínas solúveis nos extratos proteicos e frações proteicas de tubérculos do inhame *D. alata*.

EB Água – Extrato bruto em água destilada; EB Água pH 9,0 – Extrato bruto em água destilada pH 9,0; EB Glicina pH 2,6 – Extrato bruto em Glicina 0,1M NaCl 0,15M pH 2,6; EB Glicina pH 9,0 – Extrato bruto em Glicina 0,1M NaCl 0,15M pH 9,0; EB NaCl – Extrato bruto em NaCl 0,15M; EB Tris-HCl pH 7,6 – Extrato bruto em Tris-HCl 0,1M pH 7,6.

Tal resultado demonstra que na presença de água e água em pH 9,0, como soluções extratoras, foi possível extrair uma maior quantidade de proteína solúvel em relação a outros meios de extração, sendo a quantidade de proteína solúvel de 1,1988 e 1,2636 mg por mL, respectivamente. Todavia, esses resultados podem ser explicados devido à interferência de compostos fenólicos presentes nos extratos (WHIFFEN, 2007), visto que a presença de taninos foi posteriormente verificada nesses extratos.

### 3.2 Teste de tanino

Os extratos e frações de inhame *D. alata* foram submetidos ao teste qualitativo para tanino, confirmando presença deste polifenol em dois extratos, água e água pH 9,0, conforme demonstrado na Tabela 2.

Amostras	Presença de tanino
EB Água pH 7,0	+
EB Água pH 9,0	+
EB Glicina pH 2,6	-
EB Glicina pH 9,0	-
EB NaCl	-
EB Tris-HCl pH 7,6	-
Albumina	-
Globulina	-
Glutelina ácida	-
Glutelina básica	-
Prolamina	-

**Tabela 2: Presença qualitativa de tanino nos extratos e frações proteicas de tubérculos do inhame *D. alata*.**

Tal presença de taninos apenas em extratos aquosos deve-se, possivelmente, a capacidade de solubilização desses compostos em água. Resultados semelhantes foram encontrados por Adepoju (2016) para extratos de tubérculos de *D. cayennensis*, mesmo em presença de baixíssimos teores de taninos.

### 3.3 Ensaio de atividade anti-tríptica

Foi verificada a presença de inibidor de tripsina nos extratos e frações protéicas obtidos de tubérculos do inhame *D. alata* a partir do ensaio de atividade anti-tríptica. Como resultado, constata-se que foi possível detectar a presença de inibidor nas frações de glutelina ácida e básica, como demonstrado na Tabela 3.

Amostras	Absorbâncias	% Inibição	UIT/mg de proteína	% Atividade da enzima
EB Água pH 7,0	0,205	-	-	133,11
EB Água pH 9,0	0,169	-	-	109,74
Albumina	0,193	-	-	125,32
Globulina	0,235	-	-	152,59
Glutelina ácida	0,054	64,9	143,45	35,06
Glutelina básica	0,149	3,2	14,65	96,75
Prolamina	0,221	-	-	143,5
Enzima	0,154	-	-	100
Inibidor de tripsina	0,008	100	-	-

**Tabela 3: Atividade anti-tríptica nos extratos e frações protéicas de tubérculos do inhame *D. alata*.**

Para a fração glutelina ácida foi encontrado o valor de 143,45 UIT/mg de proteína e na fração glutelina básica, 14,65 UIT/mg de proteína. A presença de inibidores de tripsina em farinhas de inhame já havia sido relatada por Bhandari (2004) em diversas espécies, com valores variando na faixa de 4,1 a 20,9 mg de inibidor de tripsina por grama de amostra.

### 3.4 Ensaio de atividade hemaglutinante

Inicialmente, o ensaio de atividade hemaglutinante foi realizado com os 6 extratos brutos proteicos de tubérculos do inhame *D. alata*, tendo sido detectada atividade hemaglutinante apenas nos EB Tris pH 7,6; EB NaCl 0,15M, EB Água pH 9,0 e EB Glicina pH 9,0 (Tabela 4). Os resultados apresentados também foram expressos em termos da atividade específica em UH/mg de proteína.

Amostras	mg de proteína/mL	UH total	Atividade específica (UH/mgP)
EB Tris pH 7,6	0,8942	1600	1789,3
EB NaCl 0,15M	0,6804	6400	9406,23
EB Água pH 9,0	1,2636	1600	1266,22
Glicina pH 9,0	0,8985	1600	1780,74

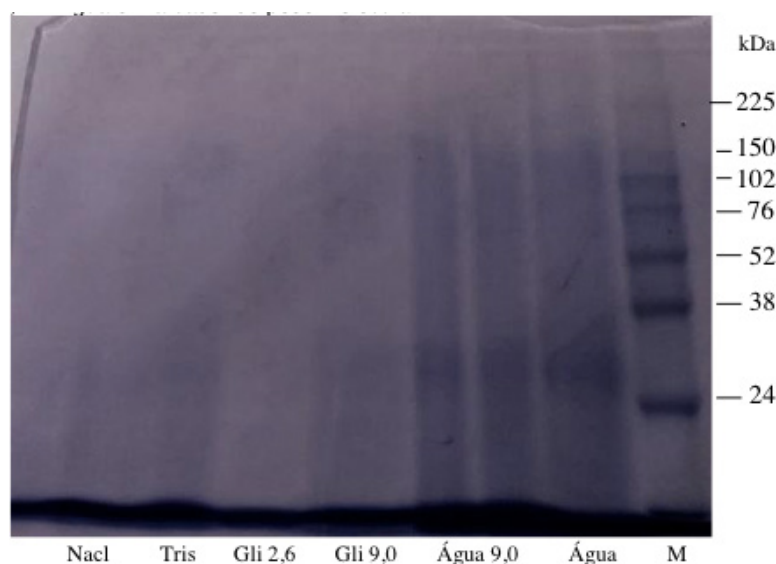
**Tabela 4: Atividade hemaglutinante em extratos proteicos de tubérculos do inhame *D. alata*.**

Nos extratos onde se detectou atividade hemaglutinante, os ensaios foram repetidos com as amostras fervidas. Tal procedimento foi feito visando assegurar que a aglutinação foi, de fato, devido à presença de lectina. Devido a sua natureza proteica, lectinas se desnaturam quando aquecidas, perdendo sua atividade biológica. Após a repetição, observou-se que o extrato em água pH 9,0 ainda apresentou hemaglutinação, indicando que a atividade observada foi devido a presença de outros fatores interferentes de natureza não protéica. Na Tabela 4, constata-se ainda que a extração com maior atividade específica foi aquela feita em solução de NaCl 0,15M, com 9406,23 UH/mgP.

Diversos outros estudos corroboram a presença de lectinas em várias espécies de inhame; como por exemplo, na espécie *D. batatas*, a qual a lectina foi isolada por Gaidamashvili (2004). Mais recentemente, foi relatada a purificação de uma lectina específica para manose existente em *D. bulbifera* (SHARMA, 2017).

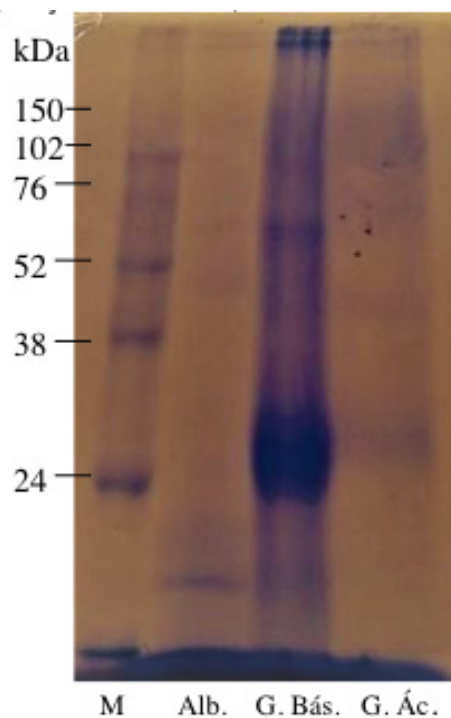
### 3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O perfil de massas relativas dos extratos e frações proteicas de tubérculos de *D. alata* foi determinado por eletroforese SDS-PAGE. Por meio dessa técnica, foi possível caracterizar a massa molecular das diferentes proteínas presentes em cada amostra, variando de 24 a 225 kDa, como demonstrado nas Figuras 4 e 5.



**Figura 4:** Perfil eletroforético das proteínas presentes nos extratos proteicos de tubérculos do inhame *D. alata*. EB NaCl 0,15M; EB Tris-HCl pH 7,6; EB Glicina pH 2,6; EB Glicina pH 9,0; EB Água pH 9,0; EB Água e marcador de peso molecular.

Ao analisar o gel da Figura 4, percebe-se que os extratos EB Água pH 9,0 e EB Água apresentam mais proteínas em termos qualitativo e quantitativo. Nestes mesmos extratos, constata-se bandas proteicas mais largas entre 24 e 38 kDa e a presença de proteínas de peso molecular maior na faixa de 150 kDa.

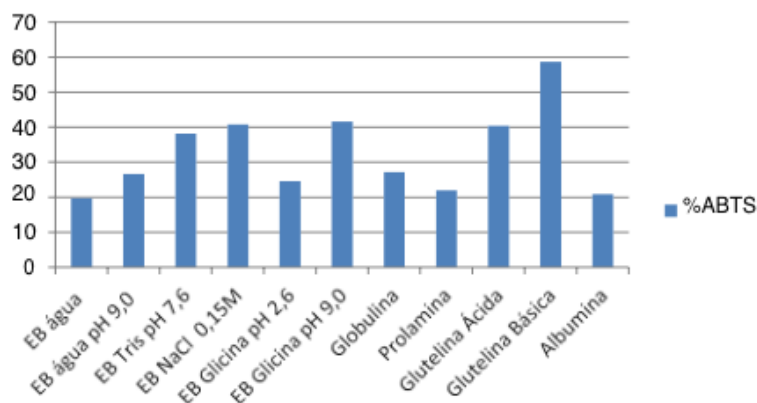


**Figura 5:** Perfil eletroforético das proteínas presentes nas frações proteicas de tubérculos do inhame *D. alata*. Marcador, frações Albumina; Glutelina básica e Glutelina ácida.

Na Figura 5, é possível observar, tanto nas frações glutelina básica como na ácida, a presença da banda proteica na faixa entre 24 e 38 kDa. Evidencia-se ainda, na fração glutelina básica, a presença de uma banda de maior peso molecular entre 52 e 76 kDa. Por outro lado, nas frações proteicas das albuminas, constata-se a presença de uma banda com peso molecular abaixo de 24 kDa.

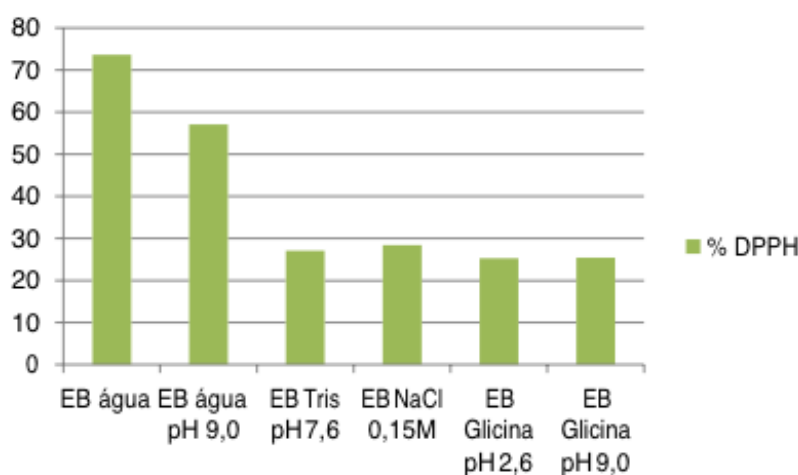
### 3.6 Determinação da atividade antioxidante

Na Figura 6 encontram-se os resultados obtidos de captura do radical ABTS pelos extratos e frações proteicas de tubérculos do inhame *D. alata*. A fração glutelina básica se destaca em sua capacidade antioxidante em relação às outras amostras analisadas, apresentando 58,25% de captura do radical ABTS. Esse resultado se assemelha aquele obtido por Chen (2007), que ao testar a capacidade de captura do radical ABTS de extratos de 2 variações da espécie *D. alata*, obteve 50% e 70% de captura deste radical.



**Figura 6:** Capacidade de captura do radical ABTS dos extratos e frações protéicas de tubérculos do inhame *D. alata*

No método de sequestro do radical livre DPPH, foram testados os extratos proteicos de tubérculos do inhame *D. alata* frente a sua capacidade antioxidante. Em contrapartida ao método de ABTS, nesse destacaram-se os extratos em água e água pH 9,0, uma vez que mostraram maior eficácia de captura do radical livre, com valores de 73,61% e 57,05%, respectivamente. Tal comportamento também pode ser explicado pela possível presença de compostos fenólicos solúveis em água, que possuem alta capacidade antioxidante (BHANDARI, 2003).



**Figura 7:** Capacidade de sequestro do radical livre DPPH dos extratos proteicos de tubérculis do inhame *D. alata*.

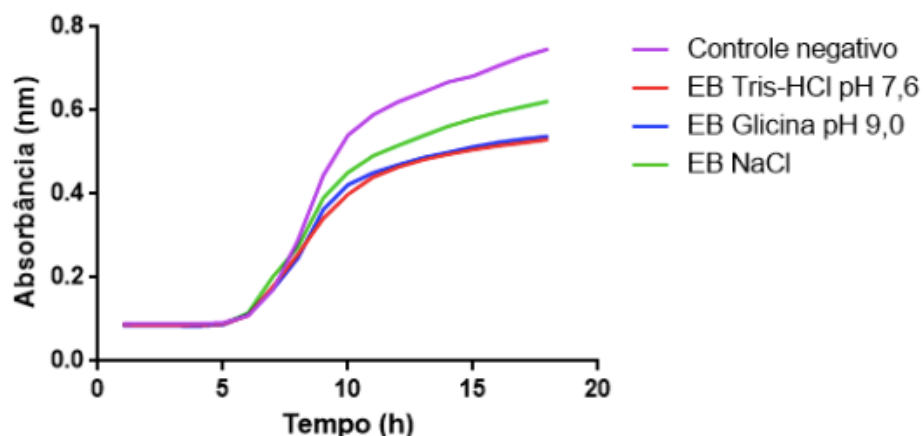
### 3.7 Determinação da atividade antimicrobiana

Para o ensaio da atividade antimicrobiana foram selecionados extratos e frações que apresentaram atividades nos testes anteriores (hemaglutinação e antioxidante), sendo eles: EB Glicina pH 9,0; EB NaCl 0,15M; EB Tris pH 7,6; EB Água pH 9,0; Glutelina ácida e Glutelina básica. Foram utilizadas 3 cepas de bactérias: *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*.

Após realizar o ensaio de atividade antimicrobiana, foi feita a análise estatística pelo teste *t*, onde constatou-se que a diferença entre as médias do controle e das



amostras não foi significativa ( $<0,05$ ), revelando que a inibição do crescimento bacteriano pelos extratos e frações testadas não foi suficiente ou seja, significativa do ponto de vista estatístico, como pode ser comprovado nas Figuras 8 e 9.



**Figura 8:** Atividade antimicrobiana dos extratos proteicos de tubérculos do inhame *D. alata* frente a cepas de *Escherichia coli*.

Contudo, estudos anteriores já demonstraram que outras espécies de *Dioscorea* possuem atividade antimicrobiana. Assim, já foi relatado que o extrato de *D. bulbifera* inibiu significativamente o crescimento de *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* e micobactérias (KUETE, 2012). Estudos com extratos de solventes orgânicos de *Dioscorea pentaphylla*, também demonstraram atividade antibacteriana significativa contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* e também a *K. pneumoniae* (PRAKASH, 2012). Esses resultados demonstram o potencial promissor de uso dos extratos de *Dioscorea* como fonte natural de medicamentos antimicrobianos, entre outros usos.

#### 4 | CONCLUSÃO

Apesar do baixo teor de proteínas solúveis nos extratos e frações dos tubérculos do inhame *Dioscorea alata*, há de se considerar a importância de suas atividades biológicas, tendo em vista a provável presença de lectinas e inibidores de tripsina em sua composição. Em relação ao seu perfil eletroforético, a espécie *D. alata* apresenta proteínas de diversos pesos moleculares, variando de menor que 24 kDa até 150 kDa, com banda proteica mais expressiva entre 24 e 38 kDa, correspondendo a proteína de reserva dioscorina (31 kDa). É fundamental que novos estudos, minimizando fatores interferentes de natureza não proteica, sejam feitos para que sua capacidade antioxidante seja mais bem compreendida e que sua atividade antimicrobiana frente a diferentes cepas bacterianas seja avaliada, para que o potencial desse alimento de grande importância regional seja verdadeiramente explorado.

## REFERÊNCIAS

- ABRAMO, M. A. **Taioba, cará e inhame: o grande potencial inexplorado**. São Paulo: Editora Ícone, p. 80, 1990.
- ADEPOJU, O. T.; BOYEJO, O.; ADENIJI, P. O. **Effects of processing methods on nutrient and antinutrient composition of yellow yam (*Dioscorea cayenensis*) products**. FoodChemistry, 2016.
- ADEYEMO, S.; ONILUDE, A. **Enzymatic reduction of anti-nutritional factors in fermenting soybeans by *Lactobacillus plantarum* isolates from fermenting cereals**. Nigerian Food Journal, v. 31, n. 2, p. 84-90, 2013.
- ALEXANDER, J.; COURSEY, D. G. **The origins of yam cultivation**. In: PETER, U. J.; DIMBLEBY, G. W. The domestication and exploitation of plants and animals. Londres, Gerald Duckworth, p. 405, 1969.
- ANUÁRIO A GRANJA DO ANO. **Cará e inhame**. Centaurus, São Paulo, p. 30- 35, 1994.
- AKORUDA, M.O. **Genetic improvement of vegetable crops: yam (*Dioscorea spp.*)**. In: KASLOO, M. **Genetic Improvement of Vegetable Crops**. Pergamon Press, p. 717–733, 1984.
- BHANDARI, M. R.; KASAI, T.; KAWABATA, J. **Nutritional evaluation of wild edible yam (*Dioscoreaspp.*) tubers of Nepal**. Food Chemistry, vol. 82, n.4, p. 619–623, 2003.
- BHANDARI, M. R.; KAWABATA, J. **Assessment of antinutritional factors and bioavailability of calcium and zinc in wild yam (*Dioscorea spp.*) tubers of Nepal**. Food Chemistry, vol. 85, n. 2, p. 281-287.
- BHANDARI, M. R., KAWABATA, J. Organic acid, phenolic content and antioxidant activity of wild yam (*Dioscorea spp.*) tubers of Nepal. **Food Chemistry**, vol. 88, p 163-168, 2004.
- BRESSAN, E. A. **Diversidade Isoenzimática e Morfológica de Inhame (*Dioscorea spp.*) coletados em Roças de Agricultura Tradicional do Vale do Ribeira – SP**. 2005, 93f. Dissertação (mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, São Paulo, 2005.
- CHEN, Y. T.; LIN, K. W. **Effects of heating temperature on the total phenolic compound, antioxidative ability and the stability of dioscorin of various yam cultivars**. Food Chemistry, vol.101, p. 955-963, 2007.
- GAIDAMASHVILI, Y.; OHIZUMI, S.; IJIMA, T.; TAKAYAMA, T. et al. **Characterization of the yam tuber storage proteins from *Dioscorea batatas* exhibiting unique lectin activities**. Journal of Biological Chemistry, vol. 279, p. 26028-26035, 2004.
- HEREDIA ZÁRATE, N.; VIEIRA, M.; MINUZZI, A. **Produção de cará (*Dioscoreasp*) em diferentes densidades de plantio**. Ciên. Agrotec., vol. 24, n. 2, p.387-391, 2000.
- HOU, W. C.; LEE, M. H.; CHEN, H. J.; LIANG, W. L., et al. **Antioxidant Activities of Dioscorin, the Storage Protein of Yam (*Dioscorea batatasDecne*) Tuber**.Agric. Food Chem., vol. 49, p. 4956-4960, 2001.
- HOU, W. C.; LIU, J. S.; CHEN, H. J.; CHEN, T. E. **Dioscorins, the major tuber storage proteins of yam (*Dioscorea batatas Decne*) with carbonic anhydrase and trypsin inhibitor activities**. J. Agric. Food Chem., vol. 47, p. 2168-2172, 1999.
- HOU, W. C.; CHEN, H. J.; LIN, Y. H. **Dioscorins from different *Dioscorea* species all exhibit both**

**carbonic anhydrase and trypsin inhibitor activities.** Bot. Bull. Acad. Sin., vol. 4, p.191-196, 2000.

KUETE, V.; BETRANDTEPONNO, R.; MBAVENG, A. T.; TAPONDJOU, L. A. et al. **Antibacterial activities of the extracts, fractions and compounds from *Dioscorea bulbifera*.** BMC Complementary and Alternative Medicine, vol. 12, p. 228, 2012.

LU, Y. L.; CHIA, C. Y.; LIU, Y. W.; HOU, W. C. **Biological Activities and Applications of Dioscorins, the Major Tuber Storage Proteins of Yam.** Journal of Traditional and Complementary Medicine, vol. 2, n.1, p. 41-46, Jan.–Mar., 2012.

MENDES, L. N.; SILVA, J. A.; FAVERO, L. A. (*in memoriam*). **Panorama da produção e comercialização do inhame no mundo e no Brasil e sua importância para o mercado pernambucano: uma análise das cinco forças competitivas.** Convibra, 2013.

NIKMARAM, N.; LEONG, S. Y.; KOUBAA, M.; ZHU, Z., et al. **Effect of extrusion on the anti-nutritional factors of food products: An overview.** Food Control, vol 79, p. 62-73, 2017.

PAULA, C. D.; PIROZI, M.; PUIATTI, M.; BORGES, J. T.; DURANGO, A. M. **Características físico-químicas e morfológicas de rizóforos de inhame (*Dioscorea alata*).** Biotecnología em el Sector Agropecuario y Agroindustrial, vol. 10, n. 2, p. 61-70, Jul-Dez., 2012.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. **Lectins as plant defense proteins.** Plante Physiology, v. 109, p.347-352, 1995.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. **Plant lectins versateli proteins with important perspectives in biotechnology.** Biotechnology and Genetic Engineering Rewiew, v. 15, p. 199-228, 1998.

POYRAZOGLU, E.; GOKMEN, V.; ARTIK, N. **Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica grganatum L.*) grown in Turkey.** Journal of Food Composition and Analysis, vol. 14, p. 567–575, 2002.

PRAKASH, G. HOSETTI, B. B. **Bio-efficacy of *Dioscorea pentaphylla* from Midmid-Western Ghats, India.** Toxicology International, vol. 19, n. 2, May- Aug., 2012.

SANTOS, E. S.; CEREDA, M. P.; PEDRALLI, G.; PUIATT, M. **Denominações populares das espécies de *Dioscorea* e *colocasia* no Brasil.** Tecnol. & Ciên. Agropec., João Pessoa, v.1, n.1, p. 37-41, set., 2007.

SHARMA, M.; VISHWANATHREDDY, H.; SINDHURA, B. R.;

KAMALANATHAN, A. S. et al. **Purification, characterization and biological significance of mannose binding lectin from *Dioscorea bulbifera* bulbils.** International Journal of Biological Macromolecules, vol. 102, p. 1146-1155, 2017.

SHARMA, S.; GUPTA, R.; DESWAL, R. ***Dioscorea alata* tuber proteome analysis shows over thirty dioscorin isoforms and novel tuber proteins.** Plant Physiology and Biochemistry, vol. 114, p. 128-137, 2017.

SHARON, N.; LIS, H. A. **Century of lectin research.** Trends in Biochemical Science, v. 12, p. 488-91, 1988.

SHEWRY, P. R. **Plant storage proteins.** Biol. Rev., v.70, p. 375-426, 1995.

SHUI, G.; LEONG, L. P. **Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by HPLC.** Journal of Chromatography A, vol. 977, n. 1, p. 89–96, 2002.

SOETAN, K.; OYEWOLE, O. **The need for adequate processing to reduce the anti-nutritional factors in plants used as human food and animal feeds: A review.** Afr. J. FoodSci.vol. 3, n. 9, p. 223-232, 2009

WHIFFEN, L. K.; MIDGLEY, D. J.; MCGEE, P. A. **Poliphenolic compounds interfere with quantification of protein in soil extracts using the Bradford method.** Soil Biology & Biochemistry, vol. 39, p. 691-694, 2007.

## ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS ALERGÊNICOS ENCONTRADOS EM PEÇAS ANATÔMICAS HUMANAS CONSERVADAS EM SOLUÇÃO DE FORMALDEÍDO

### Hércules Gonçalves de Almeida Medeiros

Graduando em Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba - UFPB/João Pessoa/PB

### Adna Cristina Barbosa de Sousa

Centro de Biotecnologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal da Paraíba - UFPB/João Pessoa/PB

**RESUMO:** A dissecação anatômica de cadáveres é uma ferramenta de ensino utilizada por educadores médicos. Os cadáveres utilizados são embalsamados com formol 10 % seguindo as práticas padrão de embalsamamento. A partir da fixação, pode-se conservar as peças anatômicas, mas um dos problemas que enfrentam os anatomistas é o crescimento de fungos em cadáveres. A partir destas considerações, este estudo teve como objetivo isolar e identificar fungos filamentosos encontrados no Laboratório de Anatomia Humana da UFPB, onde a proliferação do mesmo é visível em partes anatômicas preservadas em solução de formol, visando prevenir possíveis doenças fúngicas oportunistas. Os fungos foram coletados do ambiente e de peças anatômicas com sinais de contaminação. Em seguida, as placas foram mantidas à temperatura ambiente para crescimento. A identificação foi realizada por meio de macro e micromorfologia. Foram

identificados os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichophyton*, *Acremonium*, *Blastomyces* e *Xylohypha*. Foi avaliada a resistência dos conídios a diferentes concentrações de formol. Os isolados de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Trichophyton* sp. cresceram numa concentração de 10 % e 12 % de formol. Os resultados indicam que os cadáveres conservados com formol 10 % possuem fungos viáveis em suas superfícies que podem ser fonte de contaminação do ambiente e dos profissionais que manipulam essas peças. Este estudo ressalta a importância dos protocolos de controle de contaminação e destaca a necessidade do uso de padrões de biossegurança.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fungos filamentosos. Peças anatômicas. Biossegurança.

**ABSTRACT:** Anatomical dissection of cadavers is a teaching tool used by medical educators. The corpses used are embalmed with 10 % formaldehyde following standard embalming practices. From fixation, anatomical pieces can be preserved, but one of the problems facing anatomists is the growth of fungi in cadavers. Based on these considerations, this study aimed to isolate and identify filamentous fungi found in the Human Anatomy Laboratory of UFPB, where the proliferation of the same is visible in anatomical parts preserved in formalin solution, in order to prevent possible opportunistic fungal

diseases. The fungi were collected from the environment and from anatomical pieces with signs of contamination. Thereafter, the plates were maintained at room temperature for growth. Identification was performed through macro and micromorphology. The genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichophyton*, *Acremonium*, *Blastomyces* and *Xylohypha* were identified. The resistance of conidia to different concentrations of formaldehyde was evaluated. Isolates from *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. and *Trichophyton* sp. grew at a concentration of 10 % and 12 % formaldehyde. The results indicate that corpses preserved with 10 % formaldehyde have viable fungi on their surfaces that can be a source of contamination of the environment and the professionals who handle these pieces. This study highlights the importance of contamination control protocols and highlights the need to use biosafety standards.

**KEYWORDS:** Filamentous fungus. Anatomical parts. Biosafety.

## 1 | INTRODUÇÃO

O estudo da Anatomia Humana é fundamental nas Ciências Médicas e Biomédicas. Porém a conservação dos cadáveres, peças anatômicas, tecidos e vísceras tem sido um desafio para os profissionais que atuam nessa área, devido à proliferação de microorganismos, e de forma predominante, os fungos filamentosos (IKEDA et al., 1993; WINKELMANN, 2007).

A conservação dessas peças é feita a base de substâncias químicas, entre elas o formaldeído, o qual garante a manutenção da forma da peça anatômica por um longo período e reduz o índice de contaminação por ação microbiana (KEIL et al., 2001). Porém existem alguns micro-organismos (fungos, vírus e bactérias) que são resistentes em diferentes concentrações de formol (SPICHER; PETERS, 1976). Essa característica pode comprometer a conservação das peças anatômicas pela colonização de micro-organismos e por consequência, a contaminação do ambiente laboratorial e estudos (FISCHER; DOTT, 2003).

Dentre os micro-organismos, os fungos filamentosos são os mais resistentes e persistentes no ar atmosférico (OLONITOLA et al., 1994). Devido a esta característica, eles podem colonizar todo tipo de acervo, independente de sua constituição. A presença ou a suspeita de fungos colonizando uma coleção requer atenção imediata, uma vez que, seguramente, eles expõem o acervo e as pessoas que têm contato direto com este material a condições de risco (STEVENS et al., 2000; GÓRNY et al., 2002).

O Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba abriga uma coleção de cadáveres humanos, peças anatômicas, tecidos e vísceras, conservados em tanques e em recipientes adequados em diferentes espaços, para fins didáticos e de pesquisas. Alterações observadas na superfície de algumas peças por micro-organismos reforçam a necessidade da identificação dos mesmos, antes de realizar a limpeza ou manuseio desse material no ambiente por funcionários da Instituição. Essa prática poderá evitar a exposição e o contato de pessoas com materiais contaminados



antes de submeter este espaço a uma desinfecção adequada, prevenindo possíveis doenças secundárias.

A presença de fungos filamentosos anemófilos e a poluição do ar em ambientes acadêmicos fechados aumentam o risco de sensibilização alérgica nos docentes, discentes e técnicos (RANTIO; VIANDER, 1994; RAUTIALA et al., 1996). Estudos epidemiológicos em salas de aula de escolas e universidades com alta taxa de proliferação fúngica e poluição no ar demonstraram a ocorrência de sintomatologias respiratórias como tosse crônica, muco crônico, ofegância, dispnéia e asma (HAVERINEN et al., 1999). Esses sintomas estavam significativamente associados à contaminação ambiental por micro-organismos (JEDRYCHOOWSKI; FLAK, 1997; GÓRNY et al., 2002).

Mediante a grande preocupação relacionada ao desenvolvimento de fungos patogênicos em ambientes fechados e os problemas de saúde que esses agentes provocam, a notável proliferação fúngica em peças anatômicas conservadas em solução de formaldeído no Laboratório de Anatomia Humana da UFPB, foi o motivo para elaboração dessa proposta, visto que, a presença de fungos patogênicos em ambientes de trabalho é o suficiente para implicá-los como causadores de doenças, pois não fazem parte do ambiente natural dos Laboratórios desse tipo. A partir dessas considerações, este estudo teve por objetivo isolar e identificar fungos filamentosos encontrados no Laboratório de Anatomia Humana, onde a proliferação dos mesmos encontra-se visível nas peças anatômicas conservadas em solução de formaldeído 10 %, visando à prevenção de possíveis doenças oportunistas causadas por fungos.

## **2 | METODOLOGIA**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Genética Molecular e Biotecnologia Vegetal do Centro de Biotecnologia – CBIOTEC/UFPB.

### **2.1 Local da coleta**

A coleta foi realizada no complexo de Laboratórios de Anatomia do Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB. Foram coletadas amostras fúngicas do ambiente e das superfícies das peças anatômicas. Para a coleta do ambiente (amostras aeróbias), três placas contendo meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose foram abertas em dois ambientes do Laboratório de Anatomia. As amostras das peças anatômicas que apresentavam sinais visíveis de contaminação fúngica foram coletadas com o auxílio de cotonetes estéreis. Em seguida, as placas foram lacradas e mantidas à temperatura ambiente para crescimento, e posteriormente foi realizado o isolamento das diferentes colônias fúngicas.

## 2.2 Meio de cultura

Foi utilizado como meio para crescimento das colônias fúngicas o ágar-Sabouraud-dextrose, constituído de 1g de peptona de carne, 40 g de dextrose, 15 g de ágar e 1000 mL de água destilada apresentando pH 5,6 e autoclavado durante 15 minutos à 95 °C.

## 2.3 Manutenção da cultura fúngica

As amostras foram repicadas em tubos de ensaio contendo meio ágar-Sabouraud-dextrose, onde a cultura foi mantida à temperatura ambiente durante 15 dias e em seguida, sob refrigeração à 4 °C.

## 2.4 Cultura em lamínula

Fragmentos dos isolados fúngicos foram colocados estrategicamente sobre o meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose contidos em placas de Petri e coberto com uma lamínula previamente flambada. Após o crescimento, a cada 24 horas, as lamínulas foram tiradas e colocadas invertidas sobre uma lâmina identificada contendo o corante azul de metil e observada ao microscópio óptico para identificação dos diferentes isolados fúngicos.

## 2.5 Identificação dos isolados fúngicos

A análise foi feita mediante a avaliação dos dados macroscópicos, obtidos a partir da observação direta e dos dados microscópicos com o auxílio de microscópio óptico e de micrografias.

## 2.6 Teste de resistência ao formol

A avaliação da resistência dos conídios foi realizada em diferentes concentrações de formol (10 %, 12 %, 15 %, 17 % e 20 %) diluído em água destilada autoclavada. Uma suspensão de 108 conídios/mL mais tween 1 % foi adicionada em cada concentração do formol por um período de 5 minutos. Em seguida, 100 µl dessa suspensão foi inoculada em meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose e espalhada de forma homogênea com uma alça de Drigalski. A avaliação do crescimento dos diferentes isolados fúngicos foi realizada durante 10 dias em temperatura ambiente. Foi realizada em experimento com três repetições e um grupo controle. Para este, utilizou-se apenas água destilada e Tween para eluir os conídios.

### 3 | RESULTADO E DISCUSSÃO

#### 3.1 Identificação e caracterização dos isolados fúngicos

Foram isoladas 13 colônias fúngicas das peças anatômicas e do ambiente. Após a avaliação dos dados, foi possível chegar à definição dos gêneros característicos que estavam colonizando as peças anatômicas e o ambiente do complexo de Laboratórios de Anatomia Humana, como também averiguar quais destes isolados estavam presentes, exclusivamente, no ambiente e nas peças anatômicas ou em ambos setores (Tabela 1).

Colônias	Ambiente	Peças anatômicas
<i>Acremonium</i> sp.	+	-
<i>Penicillium</i> sp.	+	-
<i>Penicillium</i> sp.	+	-
<i>Trichophyton</i> sp.	+	-
<i>Penicillium</i> sp.	-	+
<i>Blastomyces</i> sp.	-	+
<i>Aspergillus niger</i>	+	+
<i>Aspergillus</i> sp.	+	+
<i>Penicillium</i> sp.	-	+
<i>Trichophyton</i> sp.	-	+
<i>Trichophyton</i> sp.	+	-
<i>Penicillium</i> sp.	+	-
<i>Xylohypha</i> sp.	+	-

Tabela 1 - Locais de isolamento das colônias fúngicas.

Para identificar o gênero dos isolados fúngicos que estavam colonizando as peças anatômicas conservadas em solução de formol a 10 %, realizou-se análises macroscópicas dos caracteres fenotípicos das colônias e análises microscópicas através da citologia fúngica. Dentre os gêneros e espécies isolados estão: *Acremonium* sp., *Penicillium* sp.; *Trichophyton* sp.; *Blastomyces* sp.; *Aspergillus niger* e *Aspergillus* sp. e *Xylohypha* sp. (Tabela 2).

Gênero	Número de colônias diferentes por gênero
<i>Acremonium</i> sp.	1
<i>Penicillium</i> sp.	5
<i>Trichophyton</i> sp.	3
<i>Blastomyces</i> sp.	1
<i>Aspergillus</i> sp.	2
<i>Xylohypha</i> sp.	1

Tabela 2 - Número de colônias diferentes por gênero.

As micrografias dos diferentes isolados fúngicos estão apresentadas na Figura 1. As colônias do gênero *Aspergillus* sp. desenvolveram-se após 2 dias da inoculação. Algumas eram verde-limão (*Aspergillus fumigatus*) e outras eram negras (*Aspergillus niger*). As colônias eram arredondadas ou irregulares com a borda branca. Microscopicamente, os fungos apresentaram hifas septadas e ramificadas. Observou-se fiálides formadas em cima de vesículas inchadas no final de um conidióforo longo. As colônias do gênero *Penicillium* sp. desenvolveram-se a partir do 3º dia de inoculação. As colônias eram verde-azuladas com uma borda esbranquiçada. Microscopicamente, apresentaram cadeias longas de conídios dispostos em fiálides, que eram dispostas em conidióforos ramificados.

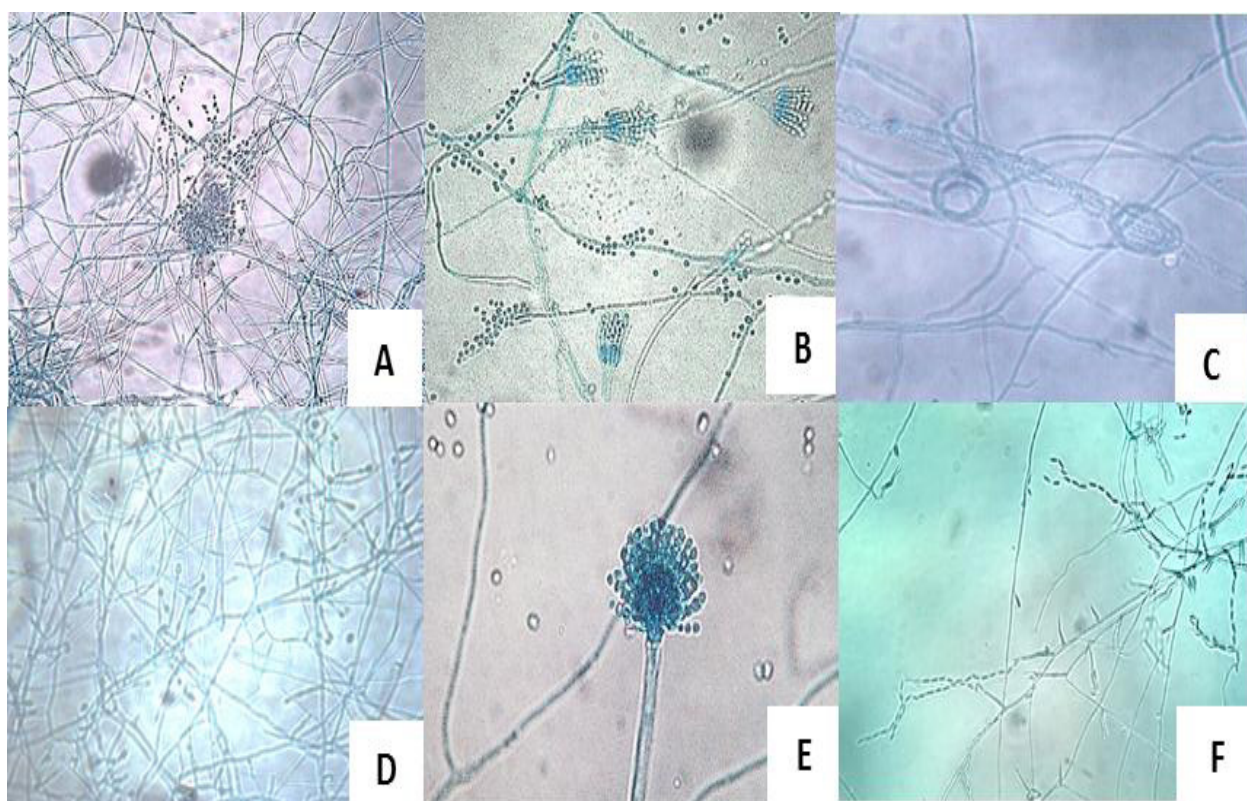


Figura 1. Micrografias dos gêneros isolados do ambiente e das peças anatómicas: *Acremonium* sp. (A); *Penicillium* sp. (B); *Trichophyton* sp. (C); *Blastomyces* sp. (D); *Aspergillus* sp. (E); *Xylohypha* sp. (F).

Fonte: Autor

As colônias do gênero *Trichophyton* sp. se desenvolveram após 10 dias depois da inoculação e exibiram uma coloração esbranquiçada. Microscopicamente, apresentaram microconídios redondos dispostos em cachos. As colônias do gênero *Acremonium* sp. apresentaram crescimento lento e uma pigmentação banca-acinzentada. As hifas eram finas e hialinas, e produziam fiálides simples. Os conídios eram unicelulares e agregados em cabeças viscosas no ápice de cada fiálide. As colônias do gênero *Blastomyces* sp. desenvolveram-se a partir do 3º dia de inoculação e exibiram uma pigmentação branca. Microscopicamente apresentaram conídios ovais

ligados a conidióforos curtos. As colônias do gênero *Xylohypha* sp. apresentaram crescimento muito lento e uma pigmentação cinza escuro com uma textura aveludada. Microscopicamente, evidenciou-se apresentar hifa septada e conídios formando cadeias onduladas.

Após identificação dos gêneros, pode se observar a presença de isolados de *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. tanto no ambiente quanto nas peças anatômicas. Esses dois grupos de fungos são considerados oportunistas pertencentes ao Filo Ascomycota, o maior Filo de fungos, que inclui quase 50% de espécies fúngicas conhecidas que podem causar alergias ao homem e aos animais (GUARRO et al., 1999).

### 3.2 Avaliação de resistência dos isolados fúngicos ao formol

A resistência dos conídios dos diferentes isolados fúngicos foi avaliada em diferentes concentrações de formol. Os resultados do experimento estão ilustrados na Tabela 3. Observou-se crescimento de *Trichophyton* sp., *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. na presença de formol a 10%. Foi constatado também crescimento de *Penicillium* sp. e *Aspergillus niger* na concentração de 12 % de formol. O crescimento dos fungos avaliados não foi inibido totalmente pelo formol. Vale ressaltar que estudos semelhantes apresentaram resultados diferentes, nos quais constataram que mesmo a baixas concentrações de formaldeído os fungos avaliados no estudo não apresentaram crescimento (PRZYBYSZ et al., 2009).

Isolado	Controle	Formol 10 %	Formol 12 %	Formol 15 %	Formol 17 %	Formol 20 %
<i>Acremonium</i> sp.	+	-	-	-	-	-
<i>Penicillium</i> sp.	+	-	-	-	-	-
<i>Penicillium</i> sp.	+	-	+	-	-	-
<i>Trichophyton</i> sp.	+	+	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+	-	-	-
<i>Aspergillus</i> sp.	+	-	-	-	-	-
<i>Penicillium</i> sp.	+	+	-	-	-	-
<i>Penicillium</i> sp.	+	-	-	-	-	-
<i>Xylohypha</i> sp.	+	-	-	-	-	-

Tabela 3. Avaliação de resistência dos isolados fúngicos ao formol.

+ crescimento; - não houve crescimento.

Os cadáveres acometidos pelos fungos avaliados no estudo estavam conservados em formol na concentração de 10 % e após este estudo inferiu-se que a concentração de 10 % de formol é ineficiente para inibir o crescimento de algumas espécies fúngicas.

O isolamento dos diferentes fungos do ambiente e das peças anatômicas conservadas a 10 % no complexo de Laboratórios de Anatomia Humana é um fato



que deve ser tratado com cautela, visto as consequências adversas à saúde que a exposição a esse agente pode causar, quando encontrado contaminando ambientes fechados (DALES et al., 2000; MEKLIN et al., 2002). Apesar das espécies do gênero *Aspergillus* serem agentes pertencente às espécies frequentemente encontradas em ambientes fechados como residências e escolas (EDUARD et al., 2001; ENGELHART et al., 2002), o desenvolvimento de fungos do gênero *Aspergillus* em Laboratórios de Anatomia Humana é o suficiente para implicá-los como causadores de doenças, pois não são contaminantes naturais da rotina nos laboratórios de anatomia humana (ANDRÉ et al., 2000).

*Aspergillus* sp. estão relacionadas a infecções broncopulmonares, sinusite, aspergiloma, micoses, infecções oculares, cardiovasculares, do sistema nervoso, epiderme, ósseas e aspergiloses invasivas, a mais comum infecção invasiva do mundo (COCKRILL; HALES, 1999; CUCCIA et al., 2000; MALCOLM, 2005; MURRAY, 2014) O gênero *Acremonium* já foi associado como causador de infecção oportunista não-comum em paciente imunocomprometido (PASTORINO et al., 2014), infecções cardiovasculares (endocardite) e disseminação hematogênica (MURRAY, 2014). Espécies do gênero *Penicillium* já foram catalogadas como relacionadas a infecções pulmonares, podendo-se citar a Peniciliose causada pelo *Penicillium marfenei*, sendo mais comum em portadores do adenovírus causando morte nestes e tendo alta prevalência na Ásia (WOLBERS et al., 2011). O gênero *Trichophyton* está comumente associado à dermatomicoses (MURRAY, 2014). A patologia mais comum relacionada ao gênero *Blastomyces* é a blastomicose fúngica causada pelo *Blastomyces dermatidis* que acomete ossos e epiderme (MURRAY, 2014). E o gênero *Xylohypha* está também associado à abscessos cerebrais não comuns causados por *Xylohypha bantiana* (LEE et al., 2003).

No presente estudo observou-se uma variedade de gêneros fúngicos que acometiam peças anatômicas biológicas e o ambiente. A conservação das peças cadavéricas é uma das preocupações que foram levadas em conta neste trabalho, pois a sua deterioração causada pelos agentes biológicos com certo grau é desagradável para os manipuladores das peças biológicas e contribui para o comprometimento do aprendizado dos alunos. Contudo a segurança com a saúde dos estudantes, professores e demais profissionais que trabalham em ambientes desta natureza não merece ser ignorada, visto que há relatos de problemas de saúde para todos os gêneros fúngicos aqui apresentados, sendo causadores desde alergias mais comuns a infecções sistêmicas em graus mais graves podendo chegar à morte, quando acometem pacientes imunocomprometidos (ALBRIGHT, 2001; DAISEY et al., 2003). *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. são mais frequentes e muitas vezes são citados em outros artigos com o mesmo objetivo de isolamento e identificação de fungos filamentosos em peças anatômicas e são possíveis causadores de alergias e doenças oportunistas nos seres humanos (ALMEIDA et al., 1988; MURRAY, 2014).

No presente trabalho notou-se que não houve crescimento fúngico em condições



de formol diluído a concentrações superiores 12 % para parte das espécies. A ANVISA regulamenta o uso do formaldeído para conservação de peças biológicas em concentrações de até 10 % com o mesmo para a segurança da saúde humana dos manipuladores e estudantes da área da saúde que inevitavelmente entrarão em contato com o material. O que pode ser feito como tentativa eficaz de redução dos micro-organismos degradadores dos cadáveres em relação ao material utilizado é sua troca regular periódica. Os custos em relação ao formaldeído não se comparam com os riscos a saúde humana quando as condições de biossegurança estão insuficientes nos ambientes laboratoriais, hospitalares, clínicas e outros ambientes (BURGE, 2002).

A preocupação com a conservação das peças anatômicas referente à sua deterioração por fungos deve ser causa de iniciativa para que haja mais cautela para o uso mais frequente de antimicrobianos nos ambientes laboratoriais, que haja sempre a preocupação com a assepsia por todos os que transitam pelos laboratórios pois acabam sendo veículos de micro-organismos no geral (CALVO, 2002).

Trocas periódicas do formaldeído utilizado para a conservação das peças anatômicas ou o uso de outros conservantes que possuam uma ação antimicrobiana superior ou igual ao formaldeído e conservem as peças anatômicas como álcool etílico, fenol e glicerina apresentando menos efeitos adversos como risco ao câncer trazidos pelo formaldeído à saúde humana (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2004) como debilitação da visão, aumento do fígado (ANVISA, 2005), irritação das mucosas (LORENZINI, 2003) é importante.

A qualificação da mão de obra dos profissionais é importante, ressaltando a necessidade de cuidados básicos como higienização das mãos, uso de antimicrobianos em bancadas e outros instrumentos ao uso adequado de vestimentas próprias para os serviços como luvas, máscaras e jalecos descartáveis (CHIA et al., 1992; MURRAY, 2014).

Nossos resultados levaram a crer que os fungos presentes nas peças anatômicas conservadas em solução de formol a 10 %, não morrem quando ficam submersos na solução dentro das cubas, mas, poderiam estar num estado de dormência. Porém quando as peças são retiradas das cubas e ficam expostas sobre as bancadas por períodos indeterminados, enquanto os estudos são efetuados, o formol das peças começa a evaporar, diminuindo sua concentração e aí os conídios dos fungos começariam a germinar, contaminando assim o ambiente do laboratório, proporcionando desta forma, um risco à saúde dos ocupantes.

## 4 | CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que foi possível identificar 13 isolados fúngicos distribuídos em 6 gêneros diferentes; Foi constatada a presença de colônias do gênero *Aspergillus* tanto no ambiente como nas peças anatômicas; Os isolados pertencentes aos gêneros *Trichophyton*, *Penicillium* e *Aspergillus* apresentaram

resistência às concentrações de 10 % e estas duas últimas não tiveram seu crescimento totalmente inibido mesmo em contato com formaldeído na concentração 12 %; Esses resultados enfatizam a necessidade da substituição da solução de formol por outras soluções conservadoras que, se possível, sejam inócuas à saúde ou, ao menos, a ela ofereçam menor risco; Face ao grau de risco para a saúde humana, graças aos gêneros encontrados neste estudo, torna-se imprescindível a adoção de medidas preventivas de proteção para os usuários do complexo de Laboratório de Anatomia Humana.

## REFERÊNCIAS

ALBRIGHT, D. M. **Human health effects of airborne mycotoxin exposure in fungi-contaminated indoor environments.** Part Ridge, v. 46, n. 11, p. 26-28, 2001.

ALMEIDA et al. **Identificação da microbiota fúngica de ambientes considerados assépticos.** Rev. Saúde pública, v. 22, n. 3, p. 201-206, 1988.

ANDRÉ, G. A. et al. **Isolamento e identificação dos patógenos microbiológicos encontrados em laboratórios de anatomia humana.** Brazilian Journal of Morphological Sciences, v. 17, p. 63, 2000.

BURGE, H. A. **An update on pollen and fungal spore aerobiology.** Journal Allergy Clin Immunol, v. 110, n. 4, p. 544-552, 2002.

CALVO, A. M. et al. **Relationship between secondary metabolism and fungal development.** Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 66, n. 3, p. 447-459, 2002.

CHIA, S. E. et al. **Medical students' exposure to formaldehyde in a gross anatomy dissection laboratory.** J Am Coll Health, v. 41, n. 3, p. 115-119, 1992.

COCKRILL, B. A.; HALES, C. A. **Allergic bronchopulmonary aspergillosis.** Annu Med Rev, v. 50, p. 303-316, 1999.

CUCCIA, V. GALARZA, M.; MONGES, J. **Cerebral Aspergillosis in children report of three cases.** Pediatric neurosurgery, v. 33, n. 1, p. 43-48, 2000.

DAISEY, J. M.; ANGELL, W. J.; APTE, M. G. **Indoor air quality, ventilation and health symptoms in schools: an analysis of existing information.** Indoor Air, v. 13, n. 1, p. 53-64, 2003.

DALES, R. E. et al. **Influence of ambient fungal spores on emergency visits for asthma to a Regional Children's Hospital.** Am J Respir Crit Care Med, v. 162, n. 6, p. 2087-2090, 2000.

EDUARD, W. et al., **Short term exposure to airborne microbial agents during farm work: exposure-response relations with eye and respiratory symptoms.** Occup Environ Med, v. 58, n. 2, p. 113-118, 2001.

ENGELHART, S. et al. **Occurrence of toxigenic *Aspergillus versicolor* isolates and sterigmatocystin in carpet dust from damp indoor environments.** Applied and Environmental Microbiology, v. 68, n. 8, p. 3886-3890, 2002.

FISCHER, G.; DOTT, W. **Relevance of airborne fungi and their secondary metabolites for environmental, occupational and indoor hygiene.** Arch Microbiol, v. 179, n. 2, p. 75-82, 2003.

- GÓRNY, L. R. et al. **Fungal fragments as indoor air biocontaminants.** Applied and Environmental Microbiology, v. 68, n. 7, p. 3522-3531, 2002.
- GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A. M. **Developments in fungal taxonomy.** Clinical Microbiology Reviews, v. 12, n. 3 p. 454-500, 1999.
- HAVERINEN, U. et al. **An approach to management of critical indoor air problems in school buildings.** Environ Health Perspect, v. 107, n. 3, p. 509-514, 1999.
- IKEDA, A. et al. **Arterial embalming method of the cadaver and its application to research.** Kaibogaku Zasshi, v. 68, n. 4, p. 410-421, 1993.
- JEDRYCHOWSKI, W.; FLAK, E. **Respiratory tract symptoms in school children exposed to indoor and outdoor air pollution.** Pneumonol Alergol Pol, v. 65, n. 1, p. 11-12, 1997.
- KEIL, C. B.; AKBAR-KHABZADEH, F.; KONECNY, K. A. **Characterizing formaldehyde emission rates in a gross anatomy laboratory.** Appl Occup Environ Hyg, v. 16, n. 10, p. 967-972, 2001.
- LEE, T.; LEE, T. L. **Successful treatment of *Xylohypha bantiana* brain abscess mimicking invasive cerebral aspergillosis in a liver transplant recipient.** Journal of infection, v. 47, n. 4, p. 348-351, 2003.
- LORENZINI, S. **Efeitos adversos da exposição ao formaldeído em cabeleiros.** 2012. 77f. Tese. (Doutorado em ciências pneumológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto alegre, 2012.
- MALCOLM, D. RICHARDSON. **Changing patterns and trends in systemic fungal infections.** Journal of antimicrobial chemotherapy, v. 56, n. 1. p.5-11. 2005.
- MEKLIN, T. et al. **Indoor air microbes and respiratory symptoms of children in moisture damaged and reference schools.** Indoor Air, v. 12, n. 3, p. 175-183, 2002.
- MURRAY,P.R. ; ROSENTHAL, K.S.; P. FALLER, M.A. **Microbiologia Médica – 7ª ed.,** Editora Elsevier, Rio de Janeiro, p. 320, 2014.
- OLONITOLA, O. S. et al. **Fungal spores in the homes of asthmatic patients in Zaria, Nigeria.** Ann Allergy, v. 73, n. 3, p. 273-274, 1994.
- PASTORINO et al. ***Acromonium kiliense* infection in a child with chronic granulomatous disease.** Brazilian Journal of Infectious Diseases, v. 9, n. 6, p. 67-74, 2005.
- PRZYBYSZ; SCOLIN; FORCATO; ARAÚJO, COSTA. **Avaliação do possível crescimento e resistência de espécies fúngicas ao formol.** Revista Saúde e Pesquisa, v. 2, n. 3, p. 325-331, 2009.
- RANTIO, L. A.; VIANDER, M. K. A. **Airborne birch pollen antigens in diferente particle sizes.** Clin Exp Allergy, v. 24, n. 1, p. 23-28, 1994.
- RAUTIALA, S. et al. **Exposure to airborne microbes during the repair of moldy buildings.** Am Ind Hyg Assoc J, v. 57, n. 3, p. 279-284, 1996.
- STEVENS, D. A.; KAN, V. L.; JUDSON, M. A.; MORRISON, V. A.; DUMMER, S.; DENNING, D. W.; BENNETT, J. E.; WALSH, T. J.; PATTERSON, T. F.; PANKEY, G. A. **Practice Guidelines for Diseases Caused by *Aspergillus*.** Clinical Infectious Diseases, v. 30, n. 4, p. 696-709, 2000.
- SPICHER, G.; PETERS, J. **Microbial resistance to formaldehyde: I comparative quantitative studies in some selected species of vegetative bacteria, bacterial spores, fungi, bacteriophages**

**and viroses.** Zentralbl Bakteriol, v. 163, n. 6, p. 486-508, 1976.

WINKELMANN A. **Anatomical dissection as a teaching method in medical school: a review of the evidence.** Med Educ, v. 41, n. 1, p. 15-22, 2007.

WOLBERS et al. **Epidemiology, Seasonality, and Predictors of Outcome of AIDS-Associated *Penicillium marneffe* Infection in Ho Chi Minh City.** Clinical infectious diseases, v. 7, n. 4, p. 945-952, 2011.

## MEIO AMBIENTE GENÉTICO E EMBRIÕES EXCEDENTÁRIOS

**Odair Bufolo**

Universidade São Francisco – Itatiba – SP

**Daiane Silva Berdusco Freire**

Universidade São Francisco – Itatiba – SP

**Andréia de Fátima Selvati Bredariol**

Universidade São Francisco – Itatiba – SP

**RESUMO:** O direito à proteção do meio ambiente genético e dos embriões excedentários não é tema de fácil solução no mundo jurídico, haja vista a ausência de legislação específica aplicada ao caso. Por inusitado, o assunto carece de jurisprudência e até entre os doutrinadores são escassas as abordagens que tragam alguma luz em tão controversa questão. Por outro lado, os avanços da medicina, propiciando o prolongamento da vida e inovadoras técnicas na área da reprodução humana, tornam reais o que até há pouco tempo seria inimaginável, permitindo que casais inférteis realizem o sonho da maternidade/paternidade, até mesmo após o falecimento do marido. Nesse contexto, surge a questão do direito à vida dos embriões excedentários formados em laboratórios, após congelados para ulterior utilização, considerando todas as consequências jurídicas, principalmente àquelas referentes à efetivação plena dos direitos fundamentais. O presente artigo buscou, através da reflexão dedutiva, alcançar

resposta plausível para o assunto, onde através da interpretação sistemática do ordenamento jurídico e de acordo com a Constituição, chegou-se a indefectível conclusão de que ao embrião excedentário devem ser garantidos todos os direitos da legislação ordinária e os direitos fundamentais constitucionais, principalmente aquele, fundante da Nação Brasileira: a dignidade da pessoa humana.

**PALAVRAS-CHAVE:** meio ambiente. embrião excedentário. direitos fundamentais.

**ABSTRACT:** The right to protection of the genetic environment and surplus embryos is not a matter of easy solution in the legal world, due to the absence of specific legislation applied to the case. Unusually, the subject lacks jurisprudence, and even among scholars there are few approaches that shed any light on such a controversial question. On the other hand, the advances in medicine, which lead to the extension of life and innovative techniques in the field of human reproduction, make real what until recently would be unimaginable, allowing infertile couples to realize the dream of motherhood / paternity, even after death of her husband. In this context, the question arises of the right to life of surplus embryos trained in laboratories, after being frozen for further use, considering all the legal consequences, especially those concerning the full realization

of fundamental rights. This article sought, through deductive reflection, to reach a plausible answer to the subject, where through the systematic interpretation of the legal system and according to the Constitution, the conclusion was reached that the surplus embryo must be guaranteed all the rights of the ordinary legislation and fundamental constitutional rights, especially that, founder of the Brazilian Nation: the dignity of the human person.

**KEYWORDS:** environment. surplus embryo. fundamental rights.

## INTRODUÇÃO

O meio ambiente, bem de uso comum do povo que deve ser preservado para as atuais e futuras gerações, possui diversas classificações doutrinárias e como bem difuso e de máxima relevância, é protegido no art. 225 da Constituição Federal. Dentre ramificações do meio ambiente, encontra-se no inciso II daquele dispositivo, a proteção ao patrimônio genético do país, nele compreendidos a integridade do patrimônio e a fiscalização das entidades de pesquisa e manipulação genéticas.

Na regulamentação desta regra constitucional, adveio a Lei 11.105/2005, Lei da Biossegurança, que aborda diversos aspectos do patrimônio genético e da manipulação das células embrionárias humanas, incluindo seu congelamento e utilização após criopreservação.

Os avanços da medicina, no campo da reprodução humana, com a possibilidade de manipulação das células reprodutivas e concepção extracorpórea, mesmo após o falecimento do marido, trouxe novos elementos a serem considerados, principalmente referentes à proteção ambiental que a Carta Magna consagra como direito inerente à Ordem Social, cujo objetivo é a busca do bem estar e a justiça social.

Este artigo busca investigar a proteção ao meio ambiente genético com ênfase ao controverso tema do embrião excedentário, citando a legislação protetiva para os embriões produzidos “in vita”, como a Constituição Federal, Código Civil, Código Penal, Estatuto da Criança e do Adolescente, Lei da Biossegurança e Lei dos Transplantes, assim como das Resoluções do Conselho Federal de Medicina, as quais não tem natureza nem efeito de norma em sentido estrito e, a constatação de que não existe legislação acerca da proteção aos embriões produzidos “in vitro”.

Abordamos o tema à luz do princípio da dignidade da pessoa humana e da realidade atual, que a partir do nascimento de Louise Brow, na Inglaterra em 1978, como o primeiro bebe de proveta da história, novos questionamento se impuseram ao mundo moderno, mormente quanto ao direito à vida e a uma existência digna dos embriões excedentários, não encontrando amparo jurídico e jurisprudencial, cabendo à Doutrina elaborar fundamentação para, por analogia, efetivar tais direitos

Num cenário onde o embrião está em desamparo, buscamos elementos de prova de sua natureza humana, para tratá-lo como sujeito de direitos e como patrimônio genético da humanidade, manipulado em clínicas de reprodução humana nacionais e



internacionais e por consequência, clamando a proteção ambiental fundamentada na Constituição, por parte do Poder Público e de toda sociedade.

## **MEIO AMBIENTE GENÉTICO**

Todos os anos, no período litúrgico da quaresma, a Igreja do Brasil apresenta à sociedade a Campanha da Fraternidade, sempre desenvolvendo temas de relevante interesse social que avançam em muito o aspecto meramente religioso, atingindo propostas que criam espaços para a reflexão e formação de consciência crítica em função da atuação social que deve ter todo cidadão brasileiro.

O tema do ano de 2017, FRATERNIDADE: Biomas Brasileiros e Defesa da Vida, com o lema Cultivar e guardar a criação (Gn 2,15), atinge em cheio um dos principais dilemas do homem moderno, que se revela em sua angústia de sobrevivência no mundo capitalista em face de valores mais profundos e contraditórios em contraste com os bens puramente materiais, ou seja, àqueles referentes à conservação do meio ambiente em todas as suas manifestações, no ensinamento do Papa Francisco na recente encíclica *Laudato si*, como explica Dom Paulo Mendes Peixoto, Arcebispo de Uberaba (MG) e presidente do Leste 2 da CNBB. (Revista Ave Maria, Ano 119, março 2017, p. 38).

Com a abrangência do tema Meio Ambiente, objetiva-se de forma inédita, alertar para a prática de manipulação genética de embriões humanos em clínicas de reprodução, pois a não observância de limites e preservação da vida humana embrionária, acarretará danos irreparáveis à sociedade, principalmente, pela violação do princípio da dignidade humana. A respeito do Meio Ambiente Genético e Embriões Excedentários, suas implicações no mundo da ética e dos direitos fundamentais, encontra-se perfeitamente ajustado ao tema geral da preservação ambiental apresentada pela Campanha da Fraternidade 2017, com a preservação dos biomas brasileiros, pois ambos cuidam da defesa da vida, mas vida que deve ser entendida em todas as suas formas, principalmente as mais indefesas.

Objetiva o artigo, através do método dedutivo, analisar a bibliografia atual sobre o assunto, artigos e trabalhos de pesquisa, a legislação pertinente e a jurisprudência. Também buscamos fundamentação teórica nas aulas e na vivência acadêmica do Curso de Direito da Universidade São Francisco, campus Itatiba – SP, principalmente nas disciplinas de Direito Penal, Direito Civil e Filosofia do Direito, onde através de instigante questionamento, despertou-se nos autores o sentimento de inquietude e indagação frente a tema tão controverso.

## **PROTEÇÃO AMBIENTAL E EMBRIÕES EXCEDENTÁRIOS**

A proteção ambiental nem sempre esteve presente em nossa sociedade.

Historicamente não foi uma preocupação do legislador constituinte - que refletiu a consciência geral de que os bens naturais eram inesgotáveis – somente foi regulada em convenções internacionais como a de Estocolmo em 1970, sobre a Eliminação de Poluentes, assinada pelo Brasil em 23 de maio de 2001, ratificada em 16 de junho de 2004, com sua entrada em vigor em 14 de setembro de 2004. (Página Oficial da Conferência de Estocolmo. [Http://chm.pops.int/Countries/StatusofRatifications/PartiesandSignatoires/tabid/4500/Default.aspx](http://chm.pops.int/Countries/StatusofRatifications/PartiesandSignatoires/tabid/4500/Default.aspx)).

A proteção ambiental fundamenta-se no artigo 225 da Constituição, inserida no Título VIII, da Ordem Social fundada no trabalho humano, com objetivo no bem estar e na justiça social. Não é fruto do acaso ou consequência natural da biodiversidade, mas do agir consciente dos atores sociais que devem cuidar, preservar, proteger o meio em que vivem, em benefício da atual e futuras gerações. Nesse sentido se expressa o artigo 225 da Constituição Federal:

Art. 225. Todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao Poder Público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações.

O meio ambiente pode ser classificado de diversas maneiras. Didaticamente, citamos os cinco significativos aspectos que o compõe, buscando identificar a atividade, que ao final, poderia degradá-lo (FIORILLO, 2015):

1- Meio Ambiente Natural, constituído por todos os elementos naturais que nos circundam, a atmosfera, as águas, a fauna, a flora, etc.

2- Meio Ambiente Artificial, que corresponde a todos os espaços urbanos ou rurais, abertos ou fechados, onde houve a intervenção humana.

3- Meio Ambiente Cultural, que constitui o patrimônio cultural do povo, sua história, cultura e sua própria formação como sociedade criadora de arte e cultura.

4- Meio ambiente do Trabalho, que é o próprio local onde as pessoas desempenham suas atividades laborais envolvendo questões de saúde e integridade física e psíquica dos trabalhadores.

5- Meio Ambiente Genético, que protege não só a vida humana, mas a vida em todas as suas formas, a diversidade e a integridade do patrimônio genético do país e a fiscalização das entidades dedicadas a pesquisa e manipulação de material genético (Art. 225, § 1º, II CF).

Artigo 225, § 1º, II - Preservar a diversidade e a integridade do patrimônio genético do País e fiscalizar as entidades dedicadas à pesquisa e manipulação de material genético.

O patrimônio genético da pessoa humana tem proteção ambiental constitucional observada em face do que determina o artigo 225, § 1º, II e V, da Carta Magna, sendo certo que a matéria foi regulamentada pela Lei nº 11.105/2005, que define no âmbito infraconstitucional a tutela jurídica dos mais importantes materiais genéticos vinculados à pessoa humana. (FIORILLO, 2015).

O destinatário da proteção ambiental é a pessoa humana. Segundo Fiorillo,

(2015, p 52), ao estabelecer em seus princípios fundamentais, a dignidade da pessoa humana, a Constituição adotou a visão antropocêntrica, atribuindo à pessoa humana o centro de todo sistema.

Pessoa humana e vida humana são conceitos intimamente ligados, pois não existe pessoa sem vida, entendida em todas as suas formas, aplicando-se a proteção ao meio ambiente genético, donde a vida humana surge e inicia o seu desenvolvimento, considerada em todas as suas expressões como destinatária do direito ambiental. Mas quando se inicia a vida humana? Pergunta irrespondível no atual estágio do desenvolvimento humano, tanto científico, como jurídico. Fiorillo (2015, p. 477) fazendo uma analogia entre a lei 9.434/97, Lei dos Transplantes, que afirma o final da vida humana com a morte encefálica, e por consequência o fim das atividades neurais/nervosas, a vida humana começaria com o início dessas atividades, “se a vida humana termina quando para a atividade nervosa, podemos concluir que a vida humana começa quando se inicia a atividade nervosa”.

Nessa linha, afirma o autor, que a vida humana começa quando inicia o sistema nervoso, a partir de 14 dias de gestação.

O assunto não é pacífico. Consideramos importante a definição jurídica do início da vida pelos reflexos principalmente nas questões referentes à ética e suas consequências no agir humano. Nesse sentido, várias correntes são expostas, com a definição jurídica do início da vida, e a proteção ao meio ambiente genético, e por consequência a proteção ao embrião, seja ele fruto de concepção “in vita” ou “in vitro”, estes considerados como os resultantes da retirada de óvulos do corpo feminino, para em ambiente extra corpóreo serem submetidos à penetração do espermatozoide masculino, como escreve Samantha K.C. Dufner (2015, p. 59):

A ciência evoluiu de modo espetacular, e na atualidade, verificamos com sucesso, formas de reprodução humana em clínicas especializadas, via métodos artificiais que manipulam os materiais genéticos masculino e feminino, utilizados in natura ou após congelamento, chamado de criopreservação. Os métodos são variados, a depender das necessidades dos envolvidos, dos custos assumidos – já que tais procedimentos são caros no Brasil – e das recomendações médicas consideradas a saúde dos pacientes. (DUFNER, 2015).

À respeito do início da vida, no Brasil há quem defenda que a Suprema Corte tenha adotado a teoria concepcionista, como a propósito escreve Danubia Cantieri Silva (2013) em *A tutela jurídica do embrião implantado à luz da dignidade da pessoa humana*:

Restou demonstrado que, as teorias acerca do início da vida são várias. Todavia, foram citadas as principais teorias: Teoria Conceptionista, Teoria da Nidação, Teoria Gradualista, Teoria das Primeiras Atividades Cerebrais, Teoria Natalista. Nesse contexto, em análise as Teorias do início da vida, a Teoria Conceptionista é a mais adequada em tutelar os direitos do embrião implantado, pois considerando-o pessoa humana em estado de latência. Assim, tendo em vista o embrião como pessoa em potencial, ele merece o respeito e dignidade que é dado a todo homem. Adepta a esse entendimento também está a Suprema Corte que na ADPF n. 54, ora demonstrada, firmou sua decisão no sentido de que ao embrião é garantido o direito

à vida. Tal questão, envolve a proteção da vida consagrado constitucionalmente e em diversos tratados internacionais subscritos pelo Brasil, inclusive a Convenção Americana de Direitos Humanos. (SILVA, 2013)

Outro entendimento é de que a vida se inicia com a nidação, ou seja, não basta o óvulo ser fecundado, é necessária sua fixação na parede uterina, o que ocorre por volta de 14 dias da fecundação, quando então se iniciam as primeiras atividades cerebrais, conforme julgamento da ADIN 3.510 pelo Supremo Tribunal Federal que definiu a legalidade constitucional da pesquisa para fins científicos utilizando-se das células tronco de embriões congelados a mais de três anos. Destacamos alguns trechos da ementa da referida ADIN 3.510, cujo acórdão possui mais de 500 páginas, onde transborda tal entendimento:

[...]O Magno Texto Federal não dispõe sobre o início da vida humana ou o preciso instante em que ela começa. Não faz de todo e qualquer estágio da vida humana um autonomizado bem jurídico, mas da vida que já é própria de uma concreta pessoa, porque nativa (teoria “natalista”, em contraposição às teorias “concepcionista” ou da “personalidade condicional”) ... Mas as três realidades não se confundem: o embrião é o embrião, o feto é o feto e a pessoa humana é a pessoa humana. Onde não existir pessoa humana embrionária, mas embrião de pessoa humana. O embrião referido na Lei de Biossegurança (“in vitro” apenas) não é uma vida a caminho de outra vida virginalmente nova, porquanto lhe faltam possibilidades de ganhar as primeiras terminações nervosas, sem as quais o ser humano não tem factibilidade como projeto de vida autônoma e irrepitível. A Lei de Biossegurança não veicula autorização para extirpar do corpo feminino esse ou aquele embrião. Eliminar ou desentranhar esse ou aquele zigoto a caminho do endométrio, ou nele já fixado. Não se cuida de interromper gravidez humana, pois dela aqui não se pode cogitar. A “controvérsia constitucional em exame não guarda qualquer vinculação com o problema do aborto.” (STF ADIN 3510 DF. Relator Ministro Aires Brito, 29.05.2008, P.03).

Nesse contexto, o embrião proveniente de relações sexuais ou por manipulação genética assistida em laboratório, conserva as características de ser humano, em que pesem as diversas teorias sobre início da vida, uma vez que a fecundação, ou seja, a união do gameta feminino ao gameta masculino já ocorreu, operando o milagre da criação e surgimento de um ser humano único, diferenciado, dotado de material genético (DNA) irrepitível. Nesse processo são produzidos embriões excedentes que não serão utilizados, os chamados embriões excedentários, cujo destino imediato será a criopreservação.

Importante destacar depoimento da Doutora Lenize Garcia, professora do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília, constante do voto do relator da ADIN 3.510, Ministro Aires Brito: (DUFNER 2015, p 82)

Nosso grupo traz o embasamento científico para afirmarmos que a vida humana começa na fecundação, tal como está colocado na solicitação da Procuradoria. (...) Já estão definidas, aí, as características genéticas desse indivíduo; já está definido se é homem ou mulher nesse primeiro momento (...). Tudo já está definido, neste primeiro momento da fecundação. Já estão definidas eventuais doenças genéticas (...). Também já estarão aí as tendências herdadas: o dom para a música, pintura, poesia. Tudo já está ali na primeira célula formada. O zigoto de Mozart já tinha dom para a música e Drummond, para a poesia. Tudo já está lá. É um ser humano irrepitível (DUFNER, 2015).

Nota-se a força da teoria concepcionista fundada em base científica irrefutável. Importante diferenciar os termos do início da vida e início da personalidade jurídica da pessoa, a última explicitada no artigo 2, Código Civil: a personalidade civil da pessoa começa do nascimento com vida, porém, a lei ressalva os direitos do nascituro desde a concepção. Conforme explica Samantha K. C. Dufner (2015, p. 91), a teoria natalista é adotada neste dispositivo, porém, em reiteradas decisões jurisprudenciais, nossos Tribunais Superiores, bem como a Doutrina, manifestam inclinação pela teoria concepcionista.

Com o desenvolvimento das pesquisas na área da reprodução humana e dentre as técnicas de reprodução artificial, destacamos a fertilização *in vitro*, ou seja, realizada fora do útero materno, onde óvulo e espermatozoide, previamente extraídos do corpo da mulher e do homem são aproximados em tubo de ensaio com determinadas técnicas e condições, acontecendo a fecundação e formação do embrião.

Tudo começou com as pesquisas desenvolvidas pelo o embriologista Robert Edwards e o ginecologista Patrick Steptoe, pesquisadores ingleses que desenvolviam novo método de fertilização. Em dezembro de 1977 anunciaram ao mundo a gravidez de Lesley Brow, que após muitos procedimentos e falhas, mais de 50 tentativas, finalmente alcançaram sucesso. O mundo acompanhou estupefato a grande notícia: o nascimento de Louise Brow após uma cesariana eletiva, no dia 25 de julho de 1978. Embora pequena, com apenas 2,608 kg, Louise era perfeita. Seu nome do meio, Joy, do inglês, alegria/felicidade, foi sugestão do próprio Dr. Steptoe, satisfeito com o sucesso das suas pesquisas em parceria com o Dr. Edwards. Assim o mundo conheceu o primeiro bebê de proveta da história que atualmente tem 40 anos e goza de excelente saúde. (<http://acervo.oglobo.globo.com/em-destaque/com-25-quilos-nasce-primeiro-bebe-de-proveta-do-mundo-na-inglaterra-em-1978-8998193>).

Na prática da fertilização *in vitro* é possível a produção em grande quantidade de embriões, que por óbvio não serão implantados, e por consequência seu destino provisório será o congelamento. Importante a reflexão que nos traz Samantha K. C. Dufner (2015, p. 69):

A maior de todas as complicações geradas a partir do procedimento é identificar que não é o embrião um mero objeto de estudo científico, nem objeto para pré-implantação, muito menos para produção em massa por questões de conveniência e oportunidade, tampouco para descarte futuro, pois trata-se de vida humana concebida com DNA único e distintivo, que apenas não se desenvolverá porque não introduzido no útero. Ele será criopreservado e assim permanecerá com todas as condições potenciais de evolução dessa vida, observados o direito de nascer, ser protegido e tratado com dignidade. (DUFNER, 2015)

Como não existe nenhuma legislação a regulamentar a produção de embriões formados pelo material de único casal nas clínicas de reprodução assistida, é certo que são produzidos em número excedente ao utilizado, é certo também que, nas palavras de Samantha K. C. Dufner (2015, p. 70), “sem nenhum regramento estão formando seres humanos para congelamento, que poderão vir a nascer, ser descartados...ou

destinados a pesquisa científica”.

Entendemos que o fato é grave demais. A lei brasileira, em diversos diplomas, protege o nascituro, ressaltando seu direito à vida e ao nascimento em condições dignas, todavia, o mesmo não ocorre para o embrião humano congelado. O Código Civil determina que a personalidade civil começa do nascimento com vida, mas a lei protege desde a concepção, os direitos do nascituro. Maria Helena Diniz comentando este artigo, expressa que:

Poder-se-ia até mesmo afirmar que, na vida intrauterina, tem o nascituro, e na vida extrauterina, tem o embrião, personalidade jurídica formal, no que atina aos direitos personalíssimos, ou melhor, aos da personalidade, visto ter a pessoa carga genética diferenciada desde a concepção, seja ela “in vivo” ou “in vitro”... Ante as novas técnicas de fertilização “in vitro” e do congelamento de embriões humanos, houve quem levantasse o problema relativo ao momento em que se deve considerar juridicamente o nascituro, entendendo-se que a vida tem início, naturalmente, com a concepção no ventre materno. Assim sendo, na fecundação na proveta, embora seja a fecundação do óvulo, pelo espermatozoide, que inicia a vida, é a nidação do zigoto ou ovo que a garantirá; logo, para alguns autores, o nascituro só será “pessoa” quando o ovo fecundado for implantado no útero materno, sob a condição do nascimento com vida. O embrião humano congelado não poderia ser tido como nascituro, apesar de dever ter proteção jurídica como pessoa virtual, com uma carga genética própria. Embora a vida se inicie com a fecundação, e a vida viável com a gravidez, que se dá com a nidação, entendemos que na verdade o início legal da consideração jurídica da personalidade é o momento da penetração do espermatozoide no óvulo, mesmo fora do corpo da mulher. Pelas razões antes expostas, oferecemos ao Deputado Fiuza a seguinte sugestão legislativa: Art. 2º A personalidade civil da pessoa começa do nascimento com vida; mas a lei põe a salvo, desde a concepção, os direitos do embrião e os do nascituro. (DINIZ, 2012).

O artigo 542 do Código Civil determina que a doação pode ser feita ao nascituro e aceita pelo representante legal. No artigo 1597, em seus incisos III e IV, trata da presunção de paternidade do marido para filhos concebidos na constância do casamento, os filhos havidos por fecundação artificial homóloga, mesmo que falecido o marido e a qualquer tempo, quando se tratar de embriões excedentários, decorrentes de concepção artificial homóloga.

O Estatuto da Criança e do Adolescente, Lei 8.069/90, artigo 7º., protege a criança e o adolescente, garantindo-lhes vida e saúde, nestes termos: “a criança e o adolescente tem direito à proteção à vida e à saúde, mediante a efetivação de políticas sociais públicas que permitam o nascimento e o desenvolvimento sadio e harmonioso em condições dignas de existência”. Com efeito, ao nascituro está garantido o direito à vida e nascimento (mas não existe alusão expressa ao embrião), sendo obrigação do Estado oferecer políticas públicas para tanto, Maria Viviane de Vasconcelos e Flávio Ferreira Pessoa Filho (2010):

O artigo 7º além de garantir a Vida e a Saúde a criança e o adolescente, possui duas peculiaridades que não podem deixar de ser comentadas, a primeira delas é relacionada à vida do nascituro, onde o artigo impõe ao Estado o dever de oferecer serviços e programas de assistência pré-natal e pós-natal. A segunda delas diz respeito a garantia de que toda criança e adolescente tenham direito a um nascimento e desenvolvimento harmonioso, não admitindo, porém o artigo 7º que a vida e o desenvolvimento de tais seres sejam desumanamente materializados.



Rezando então que não basta ter vida e saúde, se não gozar desses dois direitos de forma digna e humana. Garantindo também que tais direitos sejam garantidos por meio de políticas sociais públicas.

Na seara penal o nascituro encontra-se protegido, conforme artigo 124 do Código Penal: “provocar aborto em si mesma ou consentir que outrem lho provoque, pena de 01 (um) à 03 (três) anos de detenção”. Por outro lado, quanto ao embrião manipulado em laboratório e depois congelado é o art. 5º. da Lei 11.105/2005 que autoriza a utilização de células tronco embrionárias de embriões humanos fertilizados “in vitro” e congelados a mais de 3 anos - objeto da ADIN 3.510, de 29 de maio de 2008, citada em tópico acima. A lei 9.434/97, artigo 9. parágrafo VII, diz: “É vedado à gestante dispor de tecidos, órgãos ou partes de seu corpo vivo, exceto quando se tratar de doação de tecido para ser utilizado em transplante de medula óssea e o ato não oferecer risco à sua saúde ou ao feto”.

Em síntese, analisamos que a legislação protege, expressamente, o embrião, desde que implantado no útero materno, concebido naturalmente ou por mãos humanas, “in vitro”. A questão controvertida situa-se no campo dos embriões não implantados, conservados em congelamento. De fato, foram concebidos em laboratório – no instante da união do gameta feminino ao masculino – porém, por encontrar-se temporária ou permanentemente fora do corpo feminino, não comportam a mesma proteção do embrião implantado ou do nascituro.

Na prática, no processo de reprodução assistida que segue sem regulamentação, são produzidos muitos embriões que não serão implantados, são os chamados embriões excedentários, pois no estágio atual da medicina, é possível a produção em grande quantidade, por consequência seu destino provisório será o congelamento. E depois?

Não há proteção legal dirigida aos embriões que se encontram fora do útero materno, concebidos “in vitro”, o que é inadmissível sob a ótica do direito internacional e nacional porque se trata de vida humana. E seu direito de nascer, especialmente no contexto da proteção ao meio ambiente genético, como afirma Fiorillo (2015, p. 59/71), compreendendo a vida em todas as suas formas na proteção do direito ambiental, patrimônio genético da pessoa humana (artigos 5º e 225), direito tutelado pelo artigo 5º, XXXV, da Constituição:

O patrimônio genético da pessoa humana tem proteção ambiental constitucional observada em face do que determina o artigo 225, § 1º, II e V, iluminada pelo artigo 1º, III, da Carta Magna, sendo certo que a matéria foi devidamente regulamentada pela Lei nº 11.105/2005, que define no âmbito infraconstitucional a tutela dos mais importantes materiais genéticos vinculados à pessoa humana. (FIORILLO, 2015)

Em nada diferem, o embrião “in utero” do embrião “in vitro” congelado, no que concerne às suas características genéticas. Ambos possuem DNA irrepitível, expectativa de pleno desenvolvimento de vida futura com todas as potencialidades e desdobramentos. Como seria possível, à luz do ordenamento jurídico interpretado de maneira sistemática e observando os direitos fundamentais, negar-lhes os mais

elementares direitos como o de viverem plenamente? (DUFNER, 2015).

Samantha K.C. Dufner (2015, p. 123) lista esses direitos, em analogia aos direitos consagrados ao nascituro, como: o direito de nascer e desenvolver-se de forma sadia e harmoniosa, com saúde, com alimentos, com proteção integral, em convivência familiar, com identidade própria, direito de não ser tratado como objeto, nem transformar-se em objeto de pesquisa ou descartado, e direito de não ser morto. Contudo, a lei de Biossegurança permite o estudo de células tronco-embriônicas dos embriões excedentários congelados por período de 3 anos, e a Resolução 2.121/2015 do Conselho Federal de Medicina, permite o descarte destes embriões, após 5 anos, para qualquer fim. É a desconsideração da vida humana, sua degradação, desconsideração. Qual a razão para armazenar tantos embriões excedentários congelados em laboratório, para depois, destiná-los à pesquisa em seres vivos ou simplesmente, ao descarte?

A proteção ao meio ambiente genético e à vida nele inserida, no caso em análise o embrião com ênfase nos embriões excedentários congelados, nos conduz ao entendimento de que deve ser sopesado, revisto e controlado o procedimento de confecção de embriões humanos excedentários em laboratório, assim como, deve ser evitada a destinação destes embriões humanos para pesquisa em laboratório ou descarte, pois embriões contém vida humana e merecem tratamento digno e condizente a esta natureza. As técnicas de manipulação genética de vida devem ter limites éticos e legais para servir ao meio ambiente genético e jamais para ameaça-lo ou destruí-lo. A harmonização entre os interesses de formar uma vida humana, respeitar esta vida e fazer deste serviço uma forma de atender as futuras gerações, contribuindo para o meio ambiente é exatamente o que se espera do meio ambiente genético e da noção de preservação do Bioma conforme Campanha da Fraternidade.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O instigante tema meio ambiente genético e embriões excedentários, figura como verdadeiro desafio aos operadores do Direito, buscando resposta que satisfaça à luz da dignidade da pessoa humana e da noção de preservação ambiental, tão específico questionamento.

Nesse artigo analisamos o tema controverso, que não pode fugir da orientação dos direitos fundamentais, e devemos buscar diante da lacuna normativa, o entendimento que contemple a maior satisfação dos direitos constitucionais. De fato, o embrião humano, seja ele concebido através de relações sexuais, ou “in vitro”, pelas modernas técnicas médicas de reprodução humana é sujeito de direitos, é ser humano e como tal deve ter garantido todos os direitos a ele inerentes, à luz de uma interpretação sistemática do ordenamento jurídico e segundo a Constituição. Dessa forma não podemos chegar a outra conclusão a não ser aquela que garanta, ao

embrião excedentário, o direito à vida e a uma existência futura, de desabrochar para um projeto de vida, desenvolver livremente sua personalidade, buscar os valores que cada ser humano tem em sua singularidade e que darão sentido a sua vida.

O progresso da medicina, capaz de realizar o sonho da maternidade e da paternidade àqueles que por vias naturais são impossibilitados, e ainda mais inusitado, mesmo após o falecimento do marido, não pode trazer como consequência o desrespeito a um direito fundamental, o da própria existência. Isto ganha relevância na medida em que é feito em grande escala em todos os laboratórios, dando-nos a ideia de um vasto patrimônio genético congelado formado sem a finalidade específica de continuação da vida humana, mas desviados para a pesquisa em células tronco, destruindo o embrião, ou, para descarte, violando, propriamente, os fins esperados do artigo 225, inciso II, CF.

Por derradeiro, as técnicas modernas de reprodução assistida, sem controle legal explícito, desrespeitam regras éticas, temos um contingente de embriões, confinados em congelamento, sem supervisão, verdadeiro arsenal de seres humanos congelados, presos indefinidamente, destinados à pesquisa científica ou à própria destruição, sendo-lhes negados os mais elementares direitos humanos, na esteira de tantas atrocidades já vistas durante a II Guerra Mundial, sem direito de nascer e ter acolhimento familiar, desabrochar para uma existência onde todas as expectativas possam ser realizadas, principalmente aquela, sob a qual funda-se a nação brasileira, da sua própria dignidade.

## REFERÊNCIAS

BRASIL. Lei 10.406 de 10 de Janeiro de 2002. Net Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Leis/2002/L10406.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/2002/L10406.htm). Acesso em 30.03.2017.

BRASIL. Código Civil. NEGRÃO, Teotônio et al. Código Civil e Legislação Civil em Vigor. 28 ed. – São Paulo: Saraiva, 2009.

BRASIL. CONSTITUIÇÃO DA REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL DE 1988. Net Disponível em [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Constituicao/ConstituicaoCompilado.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Constituicao/ConstituicaoCompilado.htm). Acesso em 30.03.2017.

BRASIL. Supremo Tribunal Federal, Ação Direta de Inconstitucionalidade, nº 3.510 Distrito Federal, Tribunal Pleno. Net Disponível em: <http://www.stf.jus.br/portal/geral/verPdfPaginado.asp?id=611723&tipo=AC&descricao=Inteiro%20Teor%20ADI%20/%203510>. Acesso em 30.03.2017.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA. Resolução nº 2.121/2015: publicada no D.O.U de 24 de setembro de 2015, Seção I. p. 117. Net Disponível em: [http://www.portalmedico.org.br/resolucoes/CFM/2013/2013\\_2013.pdf](http://www.portalmedico.org.br/resolucoes/CFM/2013/2013_2013.pdf). Acesso em 07.04.2017.

DUFNER, Samantha Khoury Crepaldi. Direito de Herança do Embrião. Porto Alegre: Núria Fabris Ed., 2015.

FIORILLO, Celso Antônio Pacheco. Curso de direito Ambiental Brasileiro. 16 ed. São Paulo: Saraiva, 2015.

O GLOBO. 30 de julho de 1978, Rio de Janeiro, p. 24. O Bebe de Proveta Disponível em: <http://acervo.oglobo.globo.com/em-destaque/com-25-quilos-nasce-primeiro-bebe-de-proveta-do-mundo-na-inglaterra-em-1978-8998193>. Acesso em 10.04.2017.

Página Oficial da Conferência de Estocolmo. Net Disponível em: <Http://chm.pops.int/Countries/StatusofRatifications/PartiesandSignatoires/tabid/4500/Default.aspx>. Acesso em 30.03.2017.

PEIXOTO, D. Paulo Mendes. Biomas Brasileiros e Defesa da Vida. Revista Ave Maria, São Paulo, Ano 119, março 2017, p. 38-43.

SILVA, Regina Beatriz Tavares da (Coord.). Código Civil Comentado. 8ª ed. São Paulo: Saraiva, 2012.

SILVA, Danubia Cantieri. A tutela jurídica do embrião implantado à luz da dignidade da pessoa humana. Net. Disponível em [http://www.ambito-juridico.com.br/site/?n\\_link=revista\\_artigos\\_leitura&artigo\\_id=13108](http://www.ambito-juridico.com.br/site/?n_link=revista_artigos_leitura&artigo_id=13108). Acesso em 30.03.2017.

VASCONCELOS, Maria Viviane, PESSOA FILHO, Flaminio Ferreira. ESTATUTO DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE: Do Direito à Vida e à Saúde. Net. Novembro de 2010. Net. Disponível em: <http://www.webartigos.com/artigos/estatuto-da-crianca-e-do-adolescente-do-direito-a-vida-e-a-saude/51295/>. Acesso em 23.02.2017.

## PRODUÇÃO DE ÁCIDOS PROPANOICO E ACÉTICO POR *PROPIONIBACTERIUM ACIDIPROPIONICI* ADSORVIDA EM MONTMORILONITA K-10

### **Taciani do Santos Bella de Jesus**

Faculdade de Engenharia Química da Unicamp,  
DEPRO  
Campinas - São Paulo

### **Lucidio Cristovão Fardelone**

Instituto de Química da Unicamp  
Campinas – São Paulo

### **Gustavo Paim Valença**

Faculdade de Engenharia Química da Unicamp,  
DEPRO  
Campinas - São Paulo

### **José Roberto Nunhez**

Faculdade de Engenharia Química da Unicamp,  
DEPRO  
Campinas - São Paulo

### **José Augusto Rosário Rodrigues**

Instituto de Química da Unicamp  
Campinas - São Paulo

### **Paulo José Samenho Moran**

Instituto de Química da Unicamp  
Campinas - São Paulo

\* Os autores Taciani dos Santos Bella de Jesus e Lucidio Cristovão Fardelone contribuíram igualmente para este trabalho.

produção de ácido propanoico quando utilizadas células de *Propionibacterium acidipropionici* adsorvidas em montmorilonita K-10. Também foi desenvolvido um processo de pré-purificação do ácido propanoico do caldo fermentativo, de forma contínua, utilizando 1-octanol através do uso da técnica de perstração.

**PALAVRAS-CHAVE:** ácido propanoico, ácido acético, *Propionibacterium acidipropionici*, montmorilonita K-10, perstração.

**ABSTRACT:** The production of propanoic acid by biotechnology process is an extremely important methodology because it has Green Chemistry principles and in this work, a 30% increase in propanoic acid production was obtained when using *Propionibacterium acidipropionici* cells adsorbed in montmorillonite K-10. In addition, a process was developed of pre-purification of the propanoic acid from the fermentative broth, continuously using 1-octanol through the use of the perstraction technique.

**KEYWORDS:** propanoic acid, acetic acid, *Propionibacterium acidipropionici*, montmorilonita K 10, pertraction.

**RESUMO:** A produção de ácido propanoico via biotecnologia vem se tornando uma metodologia extremamente importante por possuir princípios de Química Verde e neste trabalho foi obtido um acréscimo de 30% na

### 1 | INTRODUÇÃO

O ácido propanoico é um dos principais produtos utilizados em processos industriais.

Na indústria química é utilizado como reagente para a obtenção de plastificantes, solventes, agentes emulsionantes, monômeros, resinas, tintas e soluções de galvanoplastia; na agricultura é utilizado como componente de herbicidas (DISHISHA *et al.*, 2012); na área farmacêutica como reagente em produção de princípios ativos (PARIZZI *et al.*, 2012); na indústria alimentícia como conservante, agente antifúngico, na constituição de sabores de frutos artificiais e panificação; na indústria de cosméticos é utilizado como constituinte de perfumes e demais produtos (CAÇCAVAL *et al.*, 2013 e CAÇCAVAL *et al.*, 2009). Também é utilizado como constituinte de produtos de alimentação animal (da COSTA *et al.*, 1999).

O mercado mundial de ácido propanoico foi de 399,4 quilotoneladas em 2014 e há expectativas de que em 2020 supere 470 quilotoneladas, com um crescimento 2,7% ao ano no período de 2014 a 2020 e em valores deste ácido e de seus derivados atingiu a marca de aproximadamente U\$ 1,6 bilhões em 2018 (BUSINESS WIRE, 2016; MARKETS AND MARKETS, 2018).

Comercialmente o ácido propanoico é produzido utilizando-se gás de petróleo liquefeito e propanol; por síntese química utilizando-se propionaldeído ou hidrólise de ésteres (ZHU *et al.*, 2012).

No entanto, processos biotecnológicos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de diminuir os custos de produção, bem como de utilizar matérias primas renováveis, por serem processos ambientalmente corretos.

Na separação do ácido propanoico em escala industrial requer um alto consumo de cal e de ácido sulfúrico, produzindo assim grandes quantidades de efluentes ácidos e resíduos sólidos de sulfato de cálcio (CAÇCAVAL *et al.*, 2013; WASEWAR e PANGAKAR, 2006).

Os processos biotecnológicos para a produção de ácido propanoico utilizando *Propionibacterium acidipropionici* são descritos na literatura, no entanto, ocorrem a produção de subprodutos, como os ácidos acético, succínico, pirúvico, bem como dióxido de carbono e acetato. Quando se utiliza glicose, como fonte de carbono, são obtidos além dos ácidos propanoico e acético o dióxido de carbono.

Com glicerol, ocorre a produção dos ácidos acético, fórmico e succínico, além de propanol (DUARTE *et al.*, 2015; COÊLHO, 2011; ZHANG e YANG, 2009). Sob condições de estresse celular, por aumento da temperatura e/ou pela própria concentração do ácido propanoico produzido, a propionibactéria desvia a sua rota de produção do ácido propanoico para o ácido acético (LIU *et al.*, 2011; SUWANNAKHAM, 2005; GU *et al.*, 1999; GU *et al.*, 1998).

Dentre os processos biotecnológicos em desenvolvimento encontram-se a reciclagem de células, reatores de leito fibroso, adsorção em argilas, sistemas de extração com aminas terciárias ou com carvão ativado (da COSTA *et al.*, 1999) e extração à base de membranas, com o intuito de produtividade.

Neste trabalho desenvolvemos um processo de perstração, pré-purificação, do ácido propanoico, com excelentes resultados de produção via biotecnologia



empregando células de *Propionibacterium acidipropionici* adsorvidas em montmorilonita K-10, seguido de separação com o uso de membranas.

No processo de perstração utiliza-se de membranas com o auxílio de aminas terciárias, pequena quantidade de solvente, tanto a amina quanto o solvente são reciclados durante o processo (BOYADZHIEV e LAZAROVA, 1995; WINDMOLLER, 1995).

Dessa maneira, a perstração consiste em uma extração com solventes orgânicos que utiliza uma membrana líquida como barreira, a qual funciona por diferença de gradiente de pH, ácido-base, formando um complexo. (CAÇCAVAL *et al.*, 2013; CAÇCAVAL *et al.*, 2009).

A perstração atua num sistema de três fases, onde o produto é extraído do meio (fase doadora), normalmente aquoso, através de um solvente orgânico imiscível em água (fase extratora) imobilizado nos poros da membrana, passando para uma solução aquosa, fase aceptora, presente no lúmen da membrana (CAÇCAVAL *et al.*, 2013).

A fase orgânica atua como uma barreira entre as fases aquosas, as fases aceptora e doadora, impedindo o contato entre elas (de OLIVEIRA *et al.*, 2008).

A não estabilidade do sistema pode ocasionar uma mistura das fases, orgânica e aquosa (WINDMOLLER, 1995), dificultado todo o processo de produção, pois pode ocasionar o contato direto do solvente com o microrganismo, ocorrendo inibição e a estagnação do processo.

Para contornar este problema se faz o uso de adsorção de células da bactéria *Propionibacterium acidipropionici* em montmorilonita K-10 (DUARTE *et al.*, 2015; MORAN *et al.*, 1999).

A montmorilonita é uma argila utilizada em processos catalíticos heterogêneos, composta essencialmente por minerais do grupo das esmectitas, apresentando fórmula química geral  $M_x(\text{Al}_{4-x}\text{Mg}_x)\text{Si}_8\text{O}_{20}(\text{OH})_4$ , possui partículas de tamanhos que podem variar de 0,1-2  $\mu\text{m}$ , com tamanho médio de aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$  e formato de placas ou lâminas (PAIVA *et al.*, 2008). Apresenta acidez superficial que é decorrente dos grupos hidroxilas terminais e da interação entre oxigênios.

Em sua cavidade residem cátions trocáveis como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Li}^+$ , fixos eletrostaticamente e com a função de compensar cargas negativas (potencial zeta negativo) geradas por substituições isomórficas que ocorrem no reticulado. Cerca de 80% dos cátions trocáveis na montmorilonita estão presentes nas galerias e 20% se encontram nas superfícies laterais (BRAIBANTE e BRAIBANTE, 2014; PAIVA *et al.*, 2008).

A água e outras moléculas polares, como ácidos orgânicos entre outras, podem penetrar entre as camadas, causando a expansão da montmorilonita K 10, aumentando sua área superficial, 500 a 760  $\text{m}^2/\text{g}$ , sendo essa propriedade a mais interessante para a sua aplicação, como suporte celular.

Essa propriedade de expansão é reversível, ao menos que a estrutura seja completamente colapsada pela remoção de todas as moléculas polares interlamelares,

as quais podem dificultar ou impossibilitar a expansão da estrutura (BRAIBANTE e BRAIBANTE, 2014).

## 2 | METODOLOGIA

Foi utilizada a bactéria *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875, que se encontra em nosso laboratório e armazenada na forma de BCM (Banco de Células Mestre) e BCT (Banco de Células de Trabalho) e, estes bancos foram preparados de acordo com os preceitos internacionais para boas práticas de produção e de laboratório (COECKE *et al.*, 2005; STACEY, 2004; HEALTH PRODUCTS AND FOOD BRANCH INSPECTORATE, 2002).

Os reagentes fosfato monobásico de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), fosfato de amônio dibásico ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ), sulfato ferroso heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato de magnésio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato de manganês heptahidratado ( $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato de zinco heptahidratado ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato de cálcio hexahidratado ( $\text{CaSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato de cobalto hexahidratado ( $\text{CoSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co, glicose da Synth, extrato de levedura industrial da Kerry, 1-octanol e montmorilonita K-10 da Merck.

Para a expansão celular da *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875 foi utilizado meio de cultura, pH 6,8, com composição de 1 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 5 mg/L de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10 mg/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2,5 mg/L de  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5 mg/L de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10 mg/L de  $\text{CaSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 10 mg/L de  $\text{CoSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 10 g/L de extrato de levedura, e 10 g/L para o inóculo e 80 g/L para os processos em biorreator. As expansões celulares, pré-inóculo e inóculo, foram mantidos em *shaker*, sob anaerobiosidade, por 24 h e 48h respectivamente, à temperatura de 30 °C e 120 rpm (CORAL *al.*, 2008).

No processo de pré-purificação se utiliza 1-octanol, assim foi necessário verificar a toxicidade deste álcool, pois este poderia entrar em contato com as células da *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875 dificultando o processo de produção.

Assim, foram realizados cultivos da *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875, tanto na ausência como presença do 1-octanol, bem como o uso de montmorilonita K-10 como suporte celular.

### 2.1 Processo de produção de ácidos propanoico e acético utilizando células livres, na ausência e presença de 1-octanol

Após as expansões celulares, pré-inóculo e inóculo, o conteúdo de 8,0 g de células foram ressuspensas em 400 mL de novo meio de cultura, contendo 80 g/L de glicose como fonte de carbono, e distribuídos em 8 frascos de 50 mL cada, hermeticamente fechados, para ocasionar anaerobiosidade. Em 4 frascos foram adicionados 540 mg/L de 1-octanol.

Todos os frascos foram colocados em estufa microbiológica por 96 horas à temperatura de 30 °C. Amostras foram retiradas a cada 24 horas para análise de produção de ácido propanoico e acético, glicose residual e pH.

## 2.2 Processo de produção de ácidos propanoico e acético utilizando células adsorvidas em montmorilonita K-10, na ausência e presença de 1-octanol

Após as expansões celulares de pré-inóculo e inóculo, 8,0 g de células, provenientes do inóculo, foram ressuspensas em 400 mL em novo meio de cultura, suplementado com 80 g/L de glicose como fonte de carbono, e este transferido de forma asséptica para um frasco de 50 mL contendo 0,9 g montmorilonita K-10 (Duarte, 2014), da mesma maneira, em 4 frascos foram adicionados 540 mg/L de 1-octanol.

Todos os frascos foram fechados hermeticamente e colocados em *shaker* e mantidos sob agitação de 100 rpm para que ocorresse a adsorção da bactéria ao suporte, mantendo-se a temperatura em 30 °C. Amostras de 1 mL a cada 24 horas foram retiradas do caldo fermentativo para análise de glicose residual, produção dos ácidos propanoico e acético e checagem de pH.

## 2.3 Método analítico

Para a análise de concentrações dos ácidos propanoico e acético, bem como o de glicose residual, foi utilizada a metodologia analítica descrita por Coral *et al.* (2008) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE, onde o detector utilizado foi o de índice de refração, com coluna Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm, Bio-rad) e fase móvel de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mmol/L, com fluxo 0,6 mL/min. e temperatura do forno de 50 °C. As quantificações dos produtos foram realizadas a partir de curvas de calibrações realizadas com padrões externos.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

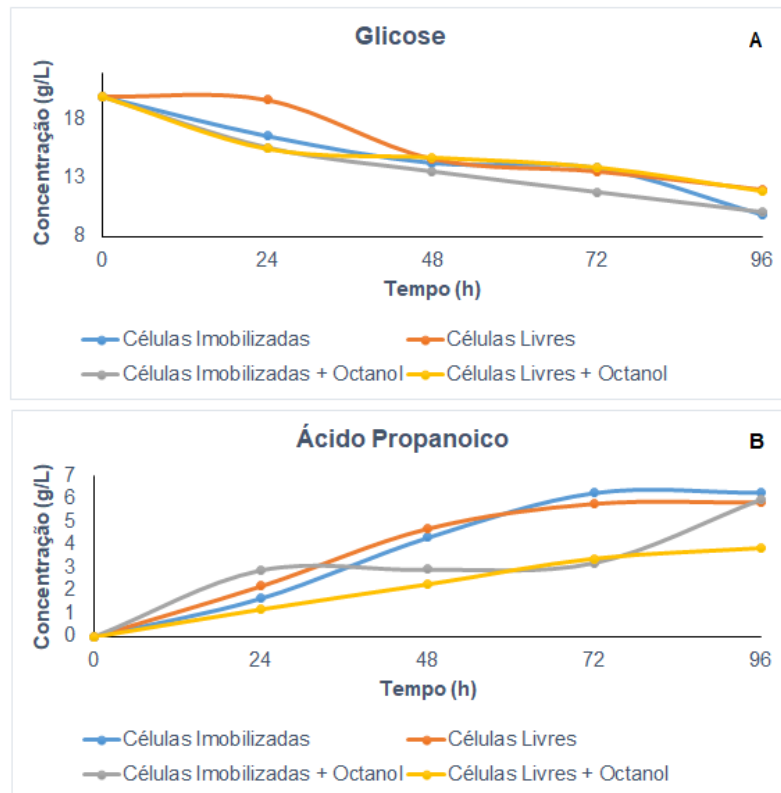
Os resultados demonstram que uma pequena quantidade de 1-octanol provoca efeitos inibitórios para as células de *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875, a pequena concentração de 540 mg/L de 1-octanol já possui este caráter de inibição, como demonstrado na Tabela 1.

1-Octanol (mg/L)	Glicose (g/L)	Ácido propanoico (g/L)	Ácido acético (g/L)	pH
0	69,96	1,85	0,90	4,21
540	70,37	0,88	0	4,40

1080	75,69	0,68	0	4,88
1620	80,00	0	0	6,26

Tabela 1 - Produção de ácidos propanoico e acético em processo de batelada em frascos, com diferentes concentrações de 1-octanol.

Na Figura 1, estão descritos os perfis de produção dos ácidos propanoico e acético, bem como o consumo de glicose, além da variação de pH durante todo o processo de batelada, por 96 horas.



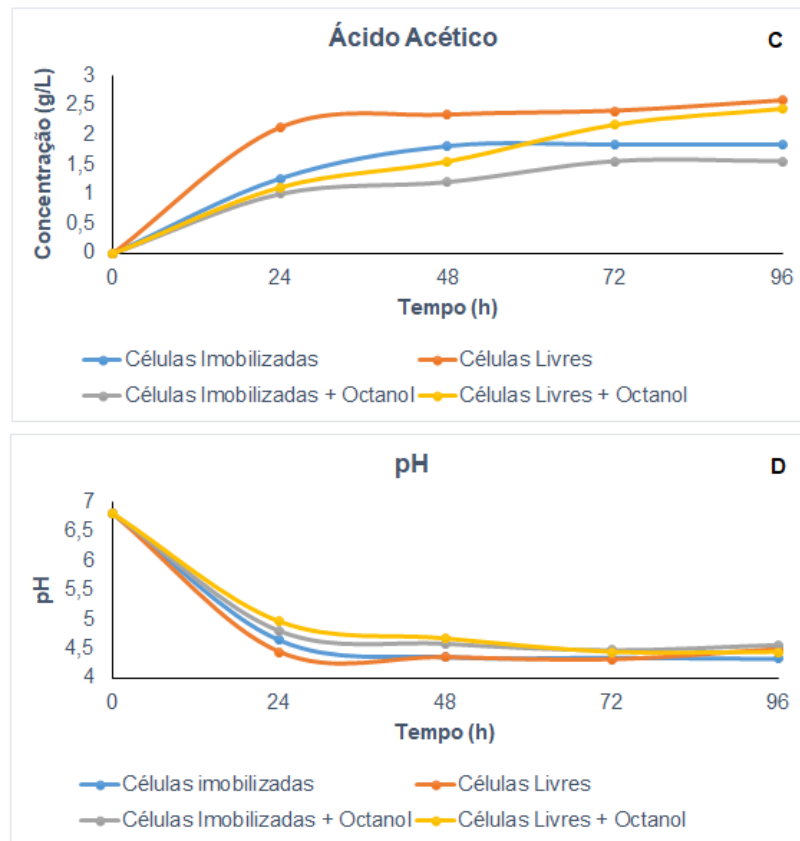


Figura 1 - Perfis do consumo de glicose (A), produção dos ácidos propanoico (B) e acético (C), e variação de pH (D) durante processo de batelada, por 96 horas.

Praticamente não há consumo de glicose, devido a alta concentração de glicose residual, 70,37 g/L, indicando que não ocorreu crescimento celular e conseqüentemente, a produção dos ácidos propanoico e acético, uma vez que esses ácidos são produtos associados ao crescimento celular, sendo obtido somente 0,88 g/L de ácido propanoico e não ocorreu a produção de ácido acético.

Já os processos com células livres de *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875, na ausência de 1-octanol, consumiu 8,02 g/L de glicose e produziu 5,82 e 2,57 g/L de ácido propanoico e acético, respectivamente.

No entanto, na presença de 1-octanol, esses valores alteram de forma significativa, principalmente para a produção de ácido propanoico, com uma produção 40% menor quando comparado com a produção com células na ausência de 1-octanol (3,83 g/L), e 6 % menor para a produção do ácido acético (2,43 g/L), embora com um consumo de glicose similar para os processos, 8,16 g/L.

Com as células de *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875 suportadas em montmorilonita K 10, na ausência de 1-octanol, forneceram 6,27 e 1,85 g/L de ácidos propanoico e acético, respectivamente, com um consumo de glicose de 10,15 g/L.

Na presença de 1-octanol o consumo de glicose foi menor, 9,95 g/L, e a produção do ácido propanoico foi de 5,47 g/L, 13% menor quando comparada com as células suportada sem 1-octanol e 30% maior quando comparadas com as células livres com 1-octanol, e para o ácido acético a produção foi de 1,55 g/L, 14% menor, fazendo-se

a mesma comparação com as células suportadas sem 1-octanol e 37% maior quando comparadas com as células livres com 1-octanol.

Assim, a montmorilonita K 10, possui um papel importante para a produção dos ácidos propanoico e acético, pois protege as células e evita o desvio metabólico para a produção do ácido acético.

## 4 | CONCLUSÕES

Montmorilonita K-10 tem papel fundamental no processo fermentativo na presença de 1-octanol, visto que protege as células de *Propionibacterium acidipropionici*, devido a sua superfície ácida e seu potencial zeta negativo, não permitindo que o 1-octanol iniba por completo o crescimento microbiano e produção dos ácidos. Mostrando que há um acréscimo de 30% na produtividade de ácido propanóico na presença de 1-octanol quando comparada com as células livres na presença de 1-octanol.

Também a Montmorilonita K-10 proporcionou a utilização da técnica de perstração para pré-purificação dos ácidos propionico e acético de forma contínua e esta metodologia poderá ser aplicada em maior escala.

## 5 | AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem os suportes financeiros do projeto: FAPESP -2016/12074-7, CAPES 1643936 e PNPd e CNPq.

## REFERÊNCIAS

BRAIBANTE, H. T.; BRAIBANTE, M. E. F. *Ciência e Natura*, v. 36, p. 724-731, 2014.

BOYADZHIEV, L.; LAZAROVA, Z. Chapter 7: Liquid Membranes (Liquid Pertraction). In: NOBLE, R. D.; STERN, S. A. *Membrane Science and Technology Principles and Applications*, Elsevier, p. 283-352, 1995.

BUSINES WIRE Global carboxylic acid market report - analysis, technologies & forecast report, *New York, E.U.A.*, p. 2016-2021, 2016.

CAŞCAVAL, D.; GALACTION, A. I.; TURNEA, M. *J. Memb. Sci.*, v 328, p. 228-237, 2009.

CAŞCAVAL, D.; POŞTARU, M.; GALACTION, A.; KLOETZER, L.; BLAGA, A. C. *Ind. Eng. Chem. Res.*, v 52, p. 2685-2692, 2013.

COELHO, D. G. Modelagem e otimização do processo de síntese do ácido propanoico via fermentação do glicerol. Faculdade de Engenharia Química - Universidade Estadual de Campinas - Unicamp, Campinas - SP, 118p (dissertação de Mestrado), 2011.

COECKE, S.; BALLS, M.; BOWE, G.; DAVIS, J.; GSTRAUNTHALER, G.; HARTUNG, T.; HAY, R.; MERTEN, O.-W.; PRICE, A.; SCHECHTMAN, L.; STACEY, G.; STOKES, W. *Guidance on Good Cell Culture Practice*. ATLA 33:261-287 (2005). Available in the Best Practices (GCCP) on the ESACT-UK. The UK Society for Cell Culture Biotechnology, website at <http://www.esactuk.org.uk/>



- CORAL, J.; KARP, S. G.; de SOUZA, V. P.; PARADA, J. L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v 151, p. 333-341, 2008
- da COSTA, J. P. L. C.; SCHORM, C.; QUESADA-CHANTO, A.; BODDEKER, K. W.; JONAS, R. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v 76, p. 99-105, 1999.
- de OLIVEIRA, A. R. M.; MAGALHÃES, I. R. S.; de SANTANA, F. J. M.; BONATO, P. S. *Química Nova*, v 31, p. 637-644, 2008.
- DISHISHA, T.; ALVARES, M. T.; KAUL, R. H. *Bioresour. Technol.*, v 118, p. 553-562, 2012
- DUARTE, J. C. Produção de ácidos orgânicos C-3 e C-4 através da fermentação de diferentes substratos por *Propionibacterium acidipropionici*. Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia Química - Universidade Estadual de Campinas - Unicamp, Campinas - SP, 228p (Tese de Doutorado), 2014.
- DUARTE, J. C.; VALENÇA, G. P.; MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R. *AMB Express*, v 5 (13), 2015.
- GU, Z.; GLATZ, B. A.; GLATZ, C. E. *Enzyme Microb. Technol.*, v 22, p. 13-18, 1998.
- GU, Z.; RICKERT, D. A.; GLATZ, B. A.; GLATZ, C. E. *Lait*, v 79, p. 137-148, 1999.
- HEALTH PRODUCTS AND FOOD BRANCH INSPECTORATE - Annex 2 to the current edition of the good manufacturing practices guidelines schedule drugs (biological drugs) - GUI-0027, 2002.
- LIU, Y.; ZHANG, Y. G.; ZHANG, R. B.; ZHANG, F.; ZHU, J. *Curr. Microbiol.*, v 62, p. 152-158, 2011.
- MARKETS AND MARKETS Propionic Acid Market & Derivatives by Applications (Animal Feed & Grain Preservatives, Food Preservatives, Herbicides, Cellulose Acetate Propionate) & Geography – Global Trends & Forecasts To 2018. *E.U.A.*, 228 p, 2018.
- MORAN, P. J. S; RODRIGUES, J. A. R.; OLIVEIRA FILHO, A. P. *Synth. Commun.*, v 29, p. 2169-2174, 1999.
- PAIVA, L. B.; MORALES, A. R.; DIAZ, F. R. *Cerâmica*, v 54, p. 213-226, 2008.
- PARIZZI, L. P.; GRASSI, M. C. B.; LLERENA, L. A.; CARAZZOLLE, M. F.; QUEIROZ, V. L.; LUNARDI, I.; ZEIDLER, A. F.; TEIXEIRA, P. J. P. L.; MIECZKOWSKI, P.; PINCONES, J.; PEREIRA, G. A. G. *BMC Genomics*, v. 13, p. 1-20, 2012.
- STACEY, G. Fundamental issues for cell-line banks in biotechnology and regulatory affairs. In life in the frozen state. B. J. Fuller, N.Lane, and E. E. Benson; Eds., CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, p. 437-452, 2004.
- TYAGI, R. D.; GUPTA S. K.; CHAND, S. Process engineering studies on continuous ethanol production by immobilized *S. cerevisiae*. *Proc. Bioch.*, v. 27, p. 23-32, 1992.
- SUWANNAKHAM, S. Metabolic engineering for enhanced propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici*, Ohio State University, Ohio - E.U.A, 258p (PhD Thesis), 2005.
- WASEWAR, K. L.; PANGAKAR, V. G. *Chem. Biochem. Eng. Q*, v 20, p. 325-331, 2006.
- WINDMOLLER, D. Extração de ácidos carboxílicos através de membranas: (perstração). Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 126p (Tese de Doutorado), 1995.

ZHANG, A.; YANG, S. T. *Proc. Biochem.*, v 44, p. 1346-1351, 2009.

ZHU, L.; WEI, P.; CAI, J.; ZHU, X.; WANG, Z.; HUANG, L.; XU, Z. *Bioresour. Technol.*, v 112, p. 248-253, 2012.

## PRODUÇÃO DE B-GLUCANASES E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E REDUÇÃO DE BIOFILME DE *Candida albicans*

### **Glaucia Hollaender Braun**

Universidade de Franca- Unifran, Núcleo de Pesquisas em Ciências Exatas e Tecnológicas, Franca-SP

### **Henrique Pereira Ramos**

Universidade de Franca- Unifran, Núcleo de Pesquisas em Ciências Exatas e Tecnológicas, Franca-SP

### **Maria Laura Lucas Natal**

Universidade de Franca- Unifran, Núcleo de Pesquisas em Ciências Exatas e Tecnológicas, Franca-SP

### **Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro**

Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” - UNESP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Araraquara- SP.

**RESUMO:** A resistência de micro-organismos aos fármacos atualmente utilizados no mercado é resultado de fatores como: mutações genéticas, intercambio de material genético, seleções evolutivas e proliferação de clones com múltiplas resistências, gerando um problema de saúde pública. O surgimento de biofilmes de *Candida albicans* como uma forma de resistência microbiana pode ser observada em superfícies sólidas, como por exemplo, em próteses totais e aparelhos ortodônticos e as opções terapêuticas para sua redução e eliminação são escassas e muitas

vezes ineficientes. Sendo metabolicamente versáteis, principalmente quanto à produção de enzimas e metabólitos secundários, os fungos filamentosos, despertam grande interesse por representarem uma opção biotecnológica aos antimicrobianos. O objetivo deste estudo foi produzir e determinar a atividade da enzima fúngica,  $\beta$ -glucanase, frente a células de *Candida albicans*. A  $\beta$ -glucanase extracelular foi obtida a partir de cultivo submerso de *Trichoderma reesei*. A atividade antimicrobiana foi analisada frente às células de *Candida albicans* para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Os resultados mostram em ensaios com células planctônicas CIM para a enzima produzida de 1,0 mg/mL e para ensaios com biofilme CIM de 1,0 mg/mL e  $IC_{50}$  de 0,785 mg/mL., enquanto para a enzima comercializada de 0,625 mg/mL e para anfotericina B de 0,010 mg/mL em ambos os ensaios. Os resultados contribuem em possíveis aplicações de produtos biotecnológicos, as enzimas fúngicas, na busca por novas alternativas terapêuticas.

**PALAVRAS-CHAVE:** enzimas,  $\beta$ -glucanases, atividade antimicrobiana, resistência microbiana, produtos naturais.

**ABSTRACT:** Antimicrobial resistance is an increasingly serious threat to global public health. Antimicrobial overuse, inappropriate prescribing, extensive agricultural use, and few

new antibiotics availability are the major factors that result in the rapid emergence of multidrug-resistant pathogens. *Candida albicans* biofilms formed in solids surfaces, such as dentures and orthodontic appliances, are associated with drastically enhanced resistance against most antimicrobial agents. In the last decades, biotechnology potential of filamentous fungi enzymes has attracted a great deal of attention for pharmaceutical applications. In this work, the enzyme  $\beta$ -glucanase was obtained from submerge culture of *Trichoderma reesei* and evaluated against planktonic cells and biofilms of *Candida albicans*. MIC of  $\beta$ -glucanase were 1.0 mg/mL against planktonic cells and biofilms and IC<sub>50</sub> were 0.785 mg/mL against biofilms. These results contributed to biotechnology applications of enzymes in pharmaceutical industry for the search of potential candidates of new drugs.

**KEYWORDS:** enzymes,  $\beta$ -glucanases, antimicrobial activity, antimicrobial resistance, biofilms, natural products

## 1 | INTRODUÇÃO

O crescente aumento da resistência aos fármacos antimicrobianos atualmente utilizados (LEVY, 2005), evidencia um grande problema na saúde pública, suscitando a importância do enfoque em pesquisas que abordem a prospecção de produtos naturais com atividade biológica para se descobrir agentes mais efetivos, menos tóxicos e com diferentes mecanismos de ação, além da correta utilização dos fármacos já disponíveis no mercado. (ANDERSON, 2005).

Historicamente produtos naturais têm relevante papel no desenvolvimento de novos fármacos. Dentre as importantes fontes naturais no desenvolvimento de novos fármacos, os microrganismos têm se destacado. Desde a descoberta da Penicilina por Fleming em 1928 um grande número de substâncias oriundas do metabolismo microbiano constitui alvos de interesse da indústria farmacêutica (BUTLER et al., 2004). Sendo metabolicamente versáteis, principalmente quanto à produção de enzimas e metabólitos secundários, os microrganismos têm demonstrado resultados bastante promissores, produzindo alta diversidade estrutural e um grande número de compostos biologicamente ativos (HAN et al., 2010).

As leveduras são fungos oportunistas que estão entre os agentes etiológicos mais comuns, causam infecções com diagnóstico e tratamento difíceis e com altos índices de mortalidade (PERLROTH ET al., 2007). Dentre as leveduras que acometem o ser humano, a *Candida albicans* é considerada uma das mais patogênicas, causando um grande número de infecções oportunistas que podem ser fatais principalmente para pacientes imunocomprometidos (LENGELER et al., 2000; SELITRENNIKOFF et al., 2001).

Assim como outros fungos, as espécies de *Candida* possuem parede celular bem definida, composta por manoproteínas,  $\beta$ -1,3-D-glucanas,  $\beta$ -1,6-D-glucanas, quitina e uma pequena quantidade de proteínas e lipídios (AKPAN; MORGAN, 2002).

Na natureza os micro-organismos podem existir como células separadas (planctônicas), ou preferencialmente, na forma de comunidades microbianas estruturadas. Os biofilmes microbianos são definidos como comunidades estruturadas de micro-organismos irreversivelmente aderidas a uma superfície, artificial ou biológica, protegida por uma matriz exopolimérica de substâncias extracelulares (PIERCE et al., 2008) e que exibem um estado metabólico distinto ao observado no crescimento planctônico, especialmente com respeito à transcrição e interações entre as células (LINDSAY; HOLY, 2006). Os microrganismos formam o biofilme como estratégia para otimizar sua sobrevivência, como uma forma adaptativa de perpetuação da espécie (MARSH, 2003), sendo constituídos por microrganismos de uma única ou de diversas espécies (COSTERTON et al., 1995). A composição do biofilme de *C. albicans* consiste em uma mistura de células hospedeiras, células em forma de leveduras, pseudo-hifas e hifas, além de matriz extracelular composta de proteínas e polissacarídeos (MUKHERJEE et al., 2005), relacionado também com má higiene oral (ALVES, 2009).

Glucanases são enzimas com amplas aplicações biotecnológicas. São produzidas por fungos filamentosos e leveduriformes, e por bactérias, que hidrolisam ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,3 presentes e  $\beta$ -D-glucanas, liberando glicose como produto principal (FLEURI; SATO, 2008). A principal função estrutural das  $\beta$ -glucanas é auxiliar a manutenção da rigidez e integridade da parede celular de fungos e leveduras (SEVIOUR et al., 1992; STONE, CLARKE, 1992), e podem ser degradadas pelas  $\beta$ -glucanases (KUMAR; DEOBAGKAR, 1996) sendo estas, hidrolases que participam diretamente do processo de controle biológico, uma vez que hidrolisam  $\beta$ -1,3-1,6-glucanas constituintes da parede celular de alguns patógenos (IORIO et al., 2008).

O uso de artefatos protéticos, como próteses totais e aparelhos ortodônticos, favorece a colonização e a consequente patogenicidade de leveduras na cavidade bucal. Embora as práticas adequadas de higiene oral desempenhem um papel fundamental na prevenção do desenvolvimento do biofilme, produtos com agentes biocidas são particularmente úteis quando a higiene oral não é a ideal. (MARINHO et al., 2013). Neste contexto, avaliamos a ação de  $\beta$ -glucanases, produzida por fermentação e adquirida comercialmente, sobre o biofilme de *C. albicans*.

## 2 | MÉTODOS

### 2.1 Cultivo dos Micro-organismos

Culturas dos fungos *Trichoderma reesei* (QM 9414) foram utilizados para a produção de glucanase. As cepas fúngicas foram mantidas em meio solidificado BDA (batata-dextrose-ágar) e submetidas a repiques periódicos a cada 30 dias. Para obtenção dos esporos 10 mL de água destilada estéril foram adicionados sobre os cultivos fúngicos por raspagem superficial das culturas obtendo suspensões de esporos

( $10^7$  esporos/mL) para o inóculo. As enzimas  $\beta$ -glucanases foram obtidas por meio de cultivos em meio líquido segundo Rapp (1989), durante 6 dias, 150 rpm a 30 °C. A levedura *C. albicans* (ATCC 90028) foi cultivada em meio ágar Sabouraud e mantida em estufa a 35.5° C por 48h para o seu completo desenvolvimento. A manutenção da cepa foi realizada a partir de repiques quinzenais

## 2.2 Obtenção do extrato enzimático

O meio de cultura resultante proveniente da fermentação, após filtração para eliminar a biomassa, foi fracionado com sulfato de amônio e triturado em almofariz (DAWSON et al., 1969). Adicionou-se lentamente sulfato de amônio ao fluido de cultura contendo a enzima até atingir o índice de saturação desejado e em seguida o extrato foi deixado em repouso “overnight” em geladeira e centrifugado por 20 min a 8000 rpm a 4 °C. Após, o precipitado foi suspenso em tampão adequado, dialisado sob agitação e refrigeração neste mesmo tampão. Ao final da diálise o extrato clarificado foi congelado e liofilizado.

## 2.3 Ensaio de atividade de $\beta$ -Glucanase

250  $\mu$ L de uma solução de laminarina (1%) dissolvida em 50  $\mu$ M de tampão de acetato pH 4,8 e 125  $\mu$ l da solução de enzima foram usadas para a reação. Depois de 30 min a 37 ° C, a reação foi interrompida pela adição de 1,5 ml de reagente DNS. Esta mistura foi fervida durante cinco minutos e depois 5mL de água foram adicionados. O açúcar redutor formado foi detectado em leitura a 540 nm por um espectrofotômetro (MILLER, 1995). Os brancos foram confeccionados da mesma maneira, excetuando que as enzimas foram previamente desnaturadas por fervura a 5 minutos.

## 2.4 Determinação da atividade antifúngica

Os extratos enzimáticos obtidos foram liofilizados e posteriormente avaliados quanto à presença de atividade antimicrobiana frente ao fungo leveduriforme *C. albicans* de acordo com as normas preconizadas pelo CLSI, Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2008).

### 2.4.1 Ensaio com células planctônicas

Em tubos tipo eppendorf foram preparadas soluções dos extratos, solubilizados em meio RPMI-1640. Para a obtenção de inóculos foram utilizadas culturas de 48 horas de *C. albicans*. As suspensões de *C. albicans* foram padronizadas na concentração de  $2 \times 10^4$  células/mL. Como controle positivo utilizou-se anfotericina B.

Em microplacas estéreis de 96 poços, realizaram-se diluições seriadas das amostras e dos controles, posteriormente acrescidas dos inóculos, totalizando um volume final de 200  $\mu$ L por poço para avaliação da atividade antifúngica. As microplacas



foram seladas e incubadas a 35 °C por 48 horas. Definiu-se como CIM a menor concentração do agente antimicrobiano capaz de inibir completamente o crescimento do microrganismo.

#### 2.4.2 Redução de biofilme de *C. albicans* em microplacas pelo método de XTT

As células de *C. albicans* foram previamente cultivadas em Sabouraud Dextrose Agar (SDA) com cloranfenicol, a 37 °C, por 48 horas. Em seguida, as células recém-cultivadas foram transferidas para o meio *Yeast Nitrogen Base* (YNB) e foram novamente incubadas a 37 °C, por 12-18 horas. Após esse período, preparou-se o inóculo através das suspensões de *C. albicans* padronizadas na concentração de 10<sup>7</sup> cel/mL.

O biofilme de *C. albicans* foi formado em microplacas de cultura de 96 orifícios, alíquotas de 100 µL das suspensões padronizadas do micro-organismo foram transferidas para orifícios da placa de cultura e incubados por 90 minutos (fase de adesão), a 37 °C, em agitador orbital (75 rpm). Após esse período, os orifícios foram lavados duas vezes com 150 µL de PBS. Em seguida, 150 µL do meio RPMI-1640 foram adicionados nos orifícios e mantidos por 48 horas, em agitador orbital (37 °C; 75 rpm), para desenvolvimento do biofilme.

Após a formação do biofilme, procedeu-se a duas lavagens com 150 µL de PBS para remoção de células não aderidas e posteriormente adicionou-se 200 µL das amostras, as quais foram avaliadas em diferentes concentrações. Como controle positivo utilizou-se anfotericina B. A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de redução de 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H-hidróxido-tetrazólio (XTT) comparando-se os biofilmes tratados aos controle sem tratamento. Para este ensaio, as amostras avaliadas foram removidas e adicionou-se 200 µL da solução de XTT em cada orifício. As placas foram incubadas no escuro a 37°C por 3 h. Após esse período, uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi transferida para uma placa de leitura, as quais foram lidas em espectrofotômetro em 490 nm e realizaram-se os cálculos de IC<sub>50</sub> das amostras testadas.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

O fungo filamentoso *Trichoderma reesei* (QM 9414) cultivado em meio líquido submerso mostrou-se produtor de glucanase, nas condições de cultivo utilizadas. O extrato liofilizado de β-Glucanase apresentou atividade biológica frente à *C. albicans* na concentração de 1,00 mg/mL (Tabela 1) e apresentou IC<sub>50</sub> de 785 µg/mL quando testado em ensaio de redução de biofilme de *C. albicans* (Tabela 2).

Amostras	CIM (mg/ml)
$\beta$ -Glucanase produzida	1,00
$\beta$ -Glucanase comercial (Sigma)	0,625
Controle positivo (anfotericina B)	0,10
Controle negativo	-

Tabela 1. Atividade de enzimas  $\beta$ -glucanases frente a *C. albicans*

Amostras	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)	CIM (mg/ml)
$\beta$ -Glucanase produzida	785,0	1,00
$\beta$ -Glucanase comercial (Sigma)	-	-
Controle positivo (anfotericina B)	3,310	0,10
Controle negativo	-	-

Tabela 2. Atividade de enzimas  $\beta$ -glucanases frente a biofilme de *C. albicans*

Não permanecem ainda muito claros os mecanismos pelos quais a enzima exerce atividade antifúngica.  $\beta$ -Glucanase possui atividade auxiliar na produção de esferoplastos de *C. albicans* (DOMANSKI, MILLER, 1968). Possivelmente a camada de  $\beta$ -Glucana é destruída por ação da enzima, demonstrando assim capacidade antimicrobiana. Outros estudos (XU et al., 2013) demonstram que  $\beta$ -Glucanase podem induzir filamentação em *C. albicans*, indicando que a enzima pode atuar como um antifúngico natural que induz a modificações morfológicas nas quais ocorre rompimento das barreiras celulares.

## 4 | CONCLUSÕES

Os resultados contribuem em possíveis aplicações de  $\beta$ -glucanases como produtos biotecnológicos na busca por novas alternativas farmacêuticas.

## REFERÊNCIAS

- Alves PM, Queiroz LMG, Pereira JV, Pereira MSV. 2009. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica *in vitro* de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. **Rev Soc Bras Med Trop** 42: 222-224.
- Anderson JB. 2005. Evolution of Antifungal-Drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. **Nat Rev** 3:547-555.
- Akpan, A.; Morgan, R. 2002. Oral candidiasis. **Postgrad Med J** 78: 455–459.
- Butler MS. 2004. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. **J Nat Prod** 67: 2141-2153.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard, 3rd ed., M27-A3. **CLSI**, Wayne, PA.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. 1995. Microbial biofilms. **Annu. Rev. Microbiol** 49:711-745.

- Dawson RMC, Elliot DC, Jones KM. 1986. Data for biochemical research (3rd ed.), **Oxford Science Publications**, 3rd ed. Oxford: Oxford University Press, pp. 1-31.
- Domanski RE, Miller RE. 1968. Use of a chitinase complex and  $\beta$ -(1,3)-glucanase spheroplast production from *Candida albicans*. **J Bacteriol** 96:270-271.
- Fleuri LF, Sato HH. 2008.  $\beta$ -1,3 Glucanases e quitinases: aplicação na lise de leveduras e inibição de fungos. **Ciênc Agrotec** 32: 1224-1231.
- Han MJ, Kim NJ, Lee SY, Chang HC. 2010. Extracellular proteome of *Aspergillus terreus* grown on different carbon sources. **Curr Genet** 56: 369–382.
- Iorio E, Torantucci A, Bromuro C, Chiani P, Ferretti A, Giannini M, Cassone A, Podo F. 2008. *Candida albicans* cell wall comprises a branched  $\beta$ -D-(1,6)-glucan with  $\beta$ -D-(1,3)-side chains. **Carbohydr Res** 343: 105-1061.
- Kumar S, Sharma NS, Saharam MR, Singh R. 2005. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochem** 40:1701–5.
- Lindsay D, von Holy A. 2006. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. **J Hosp Infect** 64:313–325.
- Lengeler KB, Davidson RC, D'Sousa C, Harashima T, Shen W, Wang P, Waugh M, Heitman J. 2000. Signal Transduction Cascades Regulating Fungal Development and Virulence. **Microbiol Mol Biol Rev** 64(4): 746- 785.
- Levy SB. 2005. Antibiotic resistance- the problem intensifies. **Adv Drug Deliv Rev** 57:1446-1450.
- Marinho VCC, Worthington HV, Walsh T, Clarkson JE. 2013. Fluoride varnishes for preventing dental caries in children and adolescents. **Cochrane Database of Systematic Reviews** 7:CD002279.
- Marsh PD. 2003. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? **Microbiology** 149: 279-94.
- Miller GL. 1995. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal Chem** 31:426-428.
- Mukherjee PK, Zhou G, Munyon R, Ghannoum MA. 2005. *Candida* biofilm: a well-designed protected environment. **Med Mycol** 43: 191–208.
- Perlroth J; Choi B, Spellberg B. 2007. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. **Med Mycol** 45: 321-346.
- Pierce CG, Uppuluri P, Tristan AR, Wormley Jr FL, Mowat E, Ramag G, et al. 2008. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nature Protocols** 3:1494-1500.
- Rapp PJ. 1989. 1,3- $\beta$ -Glucanase, 1,6- $\beta$ -Glucanase and  $\beta$ -Glucosidase Activities of *Sclerotium glaucum*: Synthesis and Properties . **J Gen Microbiol** 135: 2847-2858.
- Selitrennikoff CP, Alex L, Miller TK, Clemons KV, Simon MI, Stevens DA. 2001. Cos-1 a putative two-component histidine kinase of *Candida albicans*, is an in vivo virulence factor. **Med Mycol** 39:69–75.
- Seviour R, Stasinopoulos S, Auer D, Gibbs P. 1992. Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. **Crit Rev Biotech**, 12: 279-298.

Stone B, Clarke A. 1992. Chemistry and Biology of (1,3)  $\beta$ - Glucans. **La Trobe University Press**, Melbourne.

Xu H, Nobile CJ, Dongari-Batzoglu A. 2013. Glucanase induces filamentation of the fungal pathogen *Candida albicans*. **PLoS ONE** 8(5): e63736.

## PRODUCTION AND STABILITY OF LIPASE AND PECTINASE PRESENT IN AGROINDUSTRIAL RESIDUES

**Millena Cristiane de Medeiros Bezerra  
Jácome**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte,  
Natal/RN; PPGEQ – Programa de Pós Graduação  
em Engenharia Química; Laboratório de  
Engenharia Bioquímica)

E-mail: millena.cristiane@gmail.com

**Carlos Eduardo de Araújo Padilha  
Murilo Ricardo do Nascimento Arrais  
Maria Cecília Bezerra Caldas  
Everaldo Silvino dos Santos**

**RESUMO:** Nowadays the reuse of agroindustrial residual has been outstanding in the scientific scenario by the aggregation of value and by the reduction of damages to the environment. Part of this residue are seeds of fruits and vegetables that usually have as final destination manure or animal feed. Among these residues are the seeds of mangaba, pumpkin, avocado and bark of avocado. The production of enzymes such as lipase and pectinase have been studied being extracted directly or using these residues as a substrate for fermentative processes. The objective of this study was to evaluate the presence of these enzymes in natural residues as well as their stability. The residues were triturated and buffer was added for the extracts to be produced. The extracts obtained were subjected to lipase and pectinase activity

analyzes and the enzyme stabilities were checked after 2 hours at room temperature. The residues with the highest lipase activity were avocado seed and mangaba seed respectively (9.05 and 8.69 U / ml). The pumpkin seed also had an activity value close to the previous ones about 5.05 U / ml, whereas the avocado peel the activity of the lipase obtained was 1.43 U / ml much lower than the activities present in the seeds studied , thus showing that, for these residues, the enzyme concentration is higher in the seed than in the shell. For the pectinase activity the values obtained were closer between the residues studied and the highest was about 0.056 U / ml for the pumpkin seed. The enzymatic extracts analyzed showed a stability of about 50% within the time studied. We conclude, however, that these residues in natural, having presented enzymatic activity, can be used for future studies in the production of enzymes such as lipase and pectinase being an alternative for the use of the same.

**KEYWORDS:** enzymes; stability; agroindustrial residue.

### INTROUCTION

Nowadays the reuse of agroindustrial residual has been outstanding in the scientific scenario by the aggregation of value and by the reduction of damages to the environment. Part

of this residue are seeds of fruits and vegetables that usually have as final destination manure or animal feed. Among these residues are the seeds of mangaba, pumpkin, avocado and bark of avocado. The production of enzymes such as lipase and pectinase have been studied being extracted directly or using these residues as a substrate for fermentative processes.

## **SPECIFIC OBJECTIVES**

The objective of this study was to evaluate the presence of these enzymes in natural residues as well as their stability.

## **MATERIALS AND METHODS**

The work was developed at the Laboratory of Biochemical Engineering (LEB), which belongs to the Department of Chemical Engineering (DEQ), located at the Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), in the city of Natal, Rio Grande do Norte. The residues were triturated and buffer was added for the extracts to be produced. The extracts obtained were subjected to lipase and pectinase activity analyzes and the enzyme stabilities were checked after 2 hours at room temperature.

## **RESULTS**

The residues with the highest lipase activity were avocado seed and mangaba seed respectively (9.05 and 8.69 U / ml). The pumpkin seed also had an activity value close to the previous ones about 5.05 U / ml, whereas the avocado peel the activity of the lipase obtained was 1.43 U / ml much lower than the activities present in the seeds studied , thus showing that, for these residues, the enzyme concentration is higher in the seed than in the shell. For the pectinase activity the values obtained were closer between the residues studied and the highest was about 0.056 U / ml for the pumpkin seed. The enzymatic extracts analyzed showed stability above 50% at the time studied. The tables present the results of the study and also the comparison of the results found.

The Tables 1 and 2 - Values of Enzymatic Activity of Pectinase and Lipase for the residues studied.



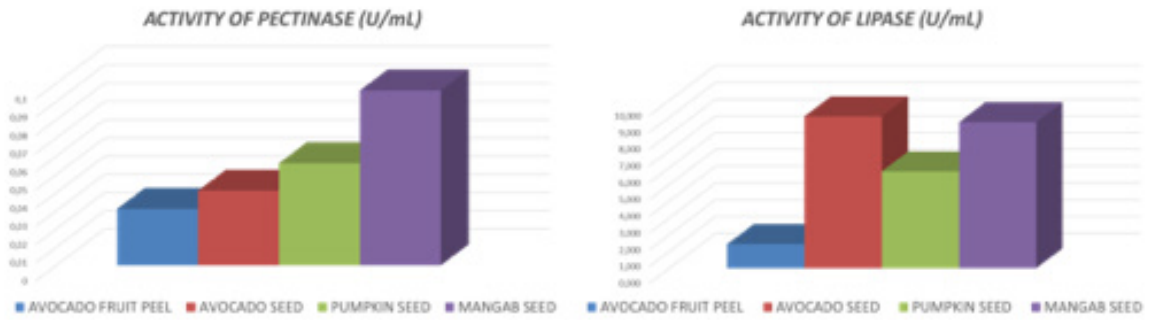


Table - 1

Table - 2

The Table 3, 4 and 5 - Stability of the enzymes after 2 hours at room temperature.

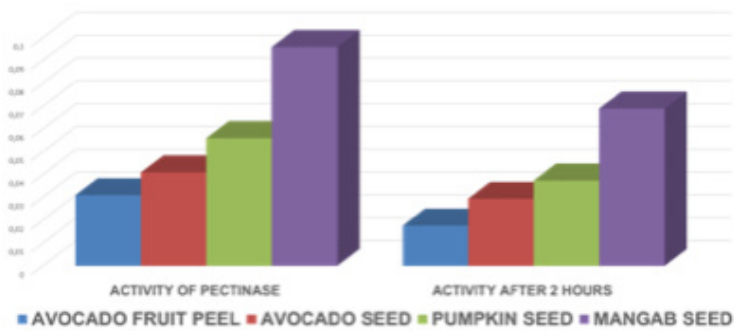


Table - 3

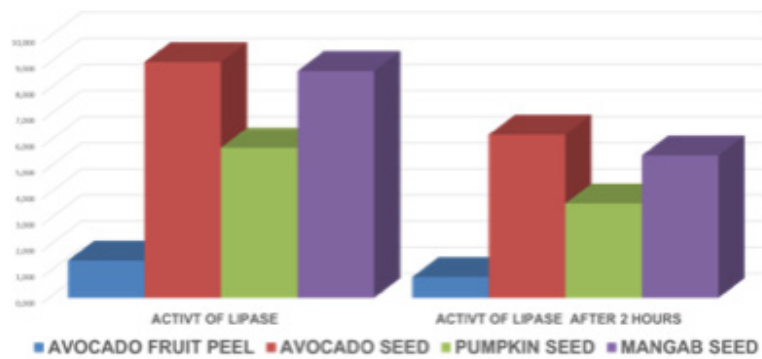


Table - 4

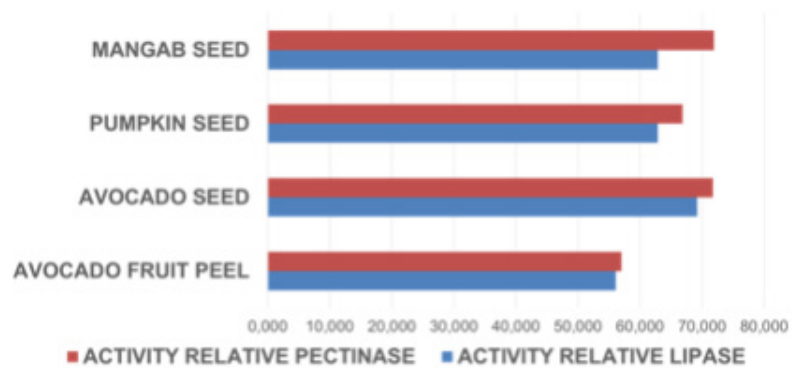


Table - 5

## CONCLUSION

We conclude, however, that these residues in natural, having presented enzymatic activity can be used for future studies in the production of enzymes such as lipase and pectinase being an alternative for the use of the same.

## REFERENCES

BEZERRA, M. C. M. Caracterização e avaliação dos óleos extraídos das sementes de melão amarelo (*Cucumis melo* L.) e mangaba (*Hancornia speciosa*): possibilidade de uso alimentício. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. UFRN, Natal, 2014.

CARDENAS, F.; CASTRO, M. S.; SANCHEZ-MONTERO, J. M.; SINISTERRA, J. V.; VALMASEDA, M.; ELSON, S. W.; ALVAREZ, E. Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. *Enzymes and Microbial Technology*, v. 28, p. 145 - 154, 2001.

CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A.; ALVES, T. L. M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, v.71, p. 45-50, 2000.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Lipases microbianas: Produção propriedades e aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, v. 62, p. 213-234, 2011.

SOUZA, F. M.; AQUINO, L. C. L., Potencial da farinha de sementes de mangaba para a produção de lipase de *Aspergillus niger*: Influência da temperatura e umidade no processo. *Scientia Plena*, 8, 121502, 2012.

## PROPRIEDADES FÍSICAS E MECÂNICAS DE UM CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO APÓS ADIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE $\text{TiO}_2$

### **Luis Eduardo Genaro**

Departamento de Clínica Infantil. Faculdade de Odontologia. UNESP - Universidade Estadual de São Paulo, Araraquara, SP, Brasil

### **Luana Mafra Marti**

Departamento de Clínica Infantil. Faculdade de Odontologia. UNESP - Universidade Estadual de São Paulo, Araraquara, SP, Brasil

### **Ana Carolina Bosco Mendes**

Departamento de Clínica Infantil. Faculdade de Odontologia. UNESP - Universidade Estadual de São Paulo, Araraquara, SP, Brasil

### **Rafael Amorim Martins**

Departamento de Clínica Infantil. Faculdade de Odontologia. UNESP - Universidade Estadual de São Paulo, Araraquara, SP, Brasil

### **Angela Cristina Cilense Zuanon**

Faculdade de Odontologia de Araraquara, Departamento de Clínica Infantil. Rua Humaitá, 1680, Centro 14801-903 - Araraquara, SP - Brasil - Caixa-postal: 331 Telefone: (16) 33016325/Fax: (16) 33016329, criszuanon@gmail.com

**RESUMO:** A associação de nanopartículas (NP) aos cimentos de ionômero de vidro (CIV) resultam na potencialização de suas propriedades antibacterianas podendo alterar suas propriedades físicas e mecânicas. A resistência do material, assim como a qualidade de sua superfície são importantes para definir o sucesso e a longevidade da restauração. O

objetivo deste trabalho foi avaliar propriedades físicas e mecânicas de um CIV após a incorporação de nanopartícula de dióxido de titânio ( $\text{NPTiO}_2$ ). Foram estabelecidos quatro grupos: Controle e CIV associado a 0,5%; 1,0% e 2,0% em peso de  $\text{NPTiO}_2$ . A dureza Vickers foi analisada por meio do microdurômetro digital (Micromet 2100). Para avaliar a compressão axial, utilizou-se máquina de testes universais (EMIC-DL 2000). A rugosidade foi estudada com auxílio de rugosímetro (Mitutoyo SJ-400) e a porosidade, por meio de avaliação de imagens em microscopia eletrônica de varredura (SM-300), e utilização do software Image J. Os dados foram analisados pela Análise de variância (ANOVA) a um critério fixo, seguida do pós-teste de Tukey, com nível de significância de 5%. Pôde-se observar que não houve alterações na resistência à compressão. A dureza superficial diminuiu para o grupo com 2,0% de  $\text{NPTiO}_2$ . A rugosidade aumentou no grupo associado a 1,0% de  $\text{NPTiO}_2$ . Quanto a porosidade, não houve alterações no número e nem na área ocupada pelos poros. Com estes resultados, conclui-se que as  $\text{NPTiO}_2$  nas concentrações estudadas não melhoram as propriedades avaliadas neste estudo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cimento de Ionômero de Vidro, Nanopartículas, Titânio.

## PHYSICAL AND MECHANICAL PROPERTIES OF A GLASS IONOMER CEMENT AFTER ADDITION OF TiO<sub>2</sub> NANOPARTICLES

**ABSTRACT:** The association of nanoparticles (NP) to glass ionomer cements (GIC) results in the potentiation of their antibacterial properties and may alter their physical and mechanical properties. The strength of the material as well as the quality of its surface are important to define the success and longevity of the restoration. The objective of this work was to evaluate the physical and mechanical properties of a GIC after the incorporation of titanium dioxide nanoparticle (NPTiO<sub>2</sub>). Four groups were established: Control and GIC associated to 0.5% or 1.0% or 2.0% by weight of NPTiO<sub>2</sub>. The Vickers hardness was analyzed by means of the digital microdurometer (Micromet 2100). To evaluate axial compression a universal testing machine (EMIC-DL 2000) was used. The roughness was studied using a rugosimeter (Mitutoyo SJ-400) and porosity by means of image evaluation in scanning electron microscopy (SM-300) and using Image J. The data were analyzed by Analysis of Variance (ANOVA) to a fixed criterion, followed by the Tukey post-test, with a significance level of 5%. It was observed that there was no change in compressive strength. The surface hardness decreased for the group with 2.0% NPTiO<sub>2</sub>. Roughness increased in the group associated with 1.0% NPTiO<sub>2</sub>. As for the porosity, there were no changes in the number or area occupied by the pores. With these results, we conclude that the NPTiO<sub>2</sub> at the studied concentrations do not improve the properties evaluated in this study.

**KEYWORDS:** Glass Ionomer Cement, nanoparticles, Titanium.

### INTRODUÇÃO

O cimento de ionômero de vidro (CIV) é um material muito utilizado em odontopediatria, pois além de outras propriedades importantes, favorece a remineralização e a reorganização da dentina afetada (Bjorndal et al., 1997; Maltz et al., 2002; Duque et al., 2009; Hayashi et al., 2011). De acordo com Takahashi et al., 2006, possui também propriedade antibacteriana que pode ser potencializada quando da utilização de clorexidina, (Deepalakshmi et al., 2010; Tüzüner et al., 2011; Cheng et al., 2012; Becci et al., 2014; Marti et al., 2014) além de nanopartículas (NP) de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) ou de óxido de zinco (ZnO)

As NP têm potencial para destruir lipídios e proteínas bacterianas, uma vez que se liga fortemente às membranas celulares. Desta maneira, promovem o aumento da permeabilidade da membrana e fluxo do conteúdo citoplasmático para fora da célula (Hajipour et al., 2012).

Existem na literatura trabalhos que estudaram a associação das NP ao CIV (Prentice et al., 2006; Moshaverinia et al., 2008; Elsaka et al. 2011; Cheng et al., 2012; Hook et al., 2014). Moshaverinia et al. (2008) demonstraram melhorias nas propriedades mecânicas e na resistência de união à dentina de um CIV convencional

após a incorporação de NP de hidroxiapatita e de fluoroapatita. Elsaka et al., 2011 associaram NP de  $\text{TiO}_2$  ( $\text{NPTiO}_2$ ) a um CIV convencional, e observaram resultados promissores com relação a resistência a compressão, à tração e atividade antibacteriana. Ao associar NP de  $\text{ZnO}$  a um CIV modificado por resina, Spencer et al. (2009) observaram melhora da atividade antibacteriana pelo o tempo de um mês.

Embora tenha se encontrado bons resultados na literatura acima descrita, muitas lacunas ainda existem nas pesquisas científicas para elucidar possíveis alterações que podem ocorrer nas propriedades antibacterianas, físicas e mecânicas do CIV quando associado às NP.

Dessa maneira, o presente estudo teve o objetivo de avaliar o efeito da incorporação de  $\text{NPTiO}_2$  em diferentes concentrações a um CIV convencional, em relação as propriedades mecânicas e físicas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foi utilizado o CIV Ketac Molar Easy Mix (3M-ESPE Dental Products, St. Paul, MN, EUA) e  $\text{NPTiO}_2$  nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 2,0% em peso. As  $\text{NPTiO}_2$  foram sintetizadas pelo Grupo de Crescimento de Cristais e Materiais Cerâmicos do Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo – USP, por meio do método precursor polimérico ou Método Pechini (Pechini, U.S. Patent, 1967).

Foram confeccionados 10 corpos de prova para cada grupo experimental: C- (Controle- CIV), G1- (CIV + 0,5%  $\text{NPTiO}_2$ ); G2- (CIV + 1,0%  $\text{NPTiO}_2$ ) e G3-(CIV + 2,0%  $\text{NPTiO}_2$ ). Utilizou-se matriz específica para cada teste a ser realizado e os corpos de prova foram armazenados em umidade relativa do ar de aproximadamente 100% e temperatura ambiente por 24 horas até o momento dos testes.

Para a avaliação da rugosidade superficial utilizou-se matriz de teflon com dimensões de 4 mm de diâmetro e 2 mm de altura. Os valores ( $R_a$ ) foram obtidos por meio de rugosímetro (Surfcorder SE 1700; Kosaka Laboratório Ltd, Kosaka, Japão), utilizando-se *cut-off* de 0,25 mm para a filtragem da ondulação superficial. Na superfície de cada corpo de prova foram efetuadas três leituras sempre passando pelo centro da amostra, e a média aritmética destas foi calculada.

Corpos de prova, com dimensões de 3 mm de altura por 6 mm de diâmetro foram utilizados para a avaliação da porosidade de material. Estes foram fraturados, e os fragmentos revestidos com liga de ouro-paládio sob alto vácuo e levados ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) (SM-300, Topcon, Tokyo, Japan) com aumento de 100 vezes para obtenção de imagens. Estas foram subdivididas em quadrantes, sendo a área do primeiro quadrante analisada para evitar tendência nos resultados. As medidas foram realizadas com auxílio do programa Image J (Rasband WS, Image J; US National Institutes of Health, Bethesda, MD). Foram realizadas três leituras de cada imagem pelo mesmo pesquisador, com uma semana de intervalo

entre as mesmas.

A dureza Vickers foi avaliada após polimento dos corpos de prova, obtidos a partir de matriz de teflon com 6 mm de diâmetro e 4 mm de altura. A análise foi realizada sobre as impressões no material feitas por uma ponta de diamante (Topaloglu-Ak et al.2012), acoplada ao microdurômetro digital (Micromet 2100 - Buehler Ltda., Lake Bluff, Illinois, EUA), com célula de carga de 50 kgf durante 30 segundos. Foram realizadas oito impressões, das quais obteve-se a média, expressas em micrometros ( $\mu\text{m}$ ), e transformadas em valores de dureza Vickers (VH) diretamente pela máquina de teste.

A resistência à compressão foi avaliada quando os corpos de prova confeccionados por meio de matriz cilíndrica de silicone de 4 mm de diâmetro e 6 mm de altura, receberam força compressiva sobre seu longo eixo a partir de uma máquina de testes universais EMIC (Instron, DL-200 MF), operando a 0.5 mm/min com carga máxima até o registro da fratura.

Os dados foram analisados pela Análise de variância (ANOVA) a um critério fixo, seguida do pós-teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

## RESULTADOS

Os resultados dos testes de dureza, resistência à compressão, rugosidade e porosidade estão dispostos nas tabelas a seguir.

Grupos	Dureza (HVN)	Compressão (MPa)
C	10,72 (4,95) <sup>ab</sup>	23,67 (13,35) <sup>a</sup>
G1	12,71 (6,40) <sup>a</sup>	27,38 (24,99) <sup>a</sup>
G2	10,28 (7,79) <sup>b</sup>	23,71 (16,39) <sup>a</sup>
G3	3,6 (1,88) <sup>c</sup>	20,07 (12,18) <sup>a</sup>

Tabela 1. Grupos experimentais, dureza superficial (HVN) e resistência à compressão (MPa), Araraquara – SP, 2017.

Letras minúsculas semelhantes nas colunas indicam não haver diferença estatisticamente significativa.

Grupos	Rugosidade (Ra)	Área poros (%)	Nº poros (n)
C	0,29 (0,09) <sup>a</sup>	2,29 (0,77) <sup>a</sup>	63,7 (27,53) <sup>a</sup>
G1	0,40 (0,14) <sup>ab</sup>	1,60 (0,50) <sup>a</sup>	48,33 (11,92) <sup>a</sup>
G2	0,55 (0,28) <sup>b</sup>	2,09 (0,34) <sup>a</sup>	58,90 (14,15) <sup>a</sup>
G3	0,47(0,22) <sup>ab</sup>	2,03 (0,94) <sup>a</sup>	66,90 (15,02) <sup>a</sup>

Tabela 2. Rugosidade (Ra), número (n) e área ocupada (%) pelos poros dos grupos experimentais, Araraquara – SP, 2017.

Letras minúsculas semelhantes nas colunas indicam não haver diferença estatisticamente significativa.



## DISCUSSÃO

O CIV é um material odontológico muito utilizado, pois possui importantes propriedades como a adesão às estruturas dentárias, biocompatibilidade e capacidade de remineralização (Robson et al., 2003). A capacidade antibacteriana do CIV pode ser potencializada quando associado a diferentes tipos de NP, em diferentes concentrações, podendo gerar alterações indesejáveis em suas propriedades físicas e mecânicas.

No presente estudo foi observado que a dureza superficial diminuiu significativamente para o G3 quando comparado ao GC (Tabela 1), pois a adição de maiores concentrações de NP aos CIV pode resultar em menor quantidade de partículas de vidro em sua superfície, tornando a reação ácida mais intensa e alterando esta propriedade do material (Moshaverina et al. 2016). As NP por possuírem tamanho menor, oferecem maior área de contato, tornando possivelmente, a quantidade de ácido poliacrílico insuficiente para recobrir todas as superfícies das partículas e prover efetivas ligações cruzadas (Gu et al. 2005).

A porosidade, também avaliada para determinar a resistência de um material restaurador, pode indicar possível aumento de permeabilidade e diminuição de durabilidade das restaurações. Essa propriedade está relacionada também com o grau de dissolução do pó e a formação de aglomerados frequentemente presentes, quando tendem a aumentar a rugosidade superficial, e longevidade clínica do material (Setchell et al., 1985). Neste estudo, nota-se que não houve alterações no número e nem na área ocupada pelos poros quando da adição de NPTiO<sub>2</sub> (Tabela 2). Considerando que grande número e área ocupada por porosidades podem resultar em trincas e fraturas do material (Mitchell et al. 1997), a semelhança com o grupo controle observada neste estudo pode ser considerada como um resultado positivo. Fortes ligações entre as NP e o material polimérico resultam em melhores propriedades mecânicas, e a baixa porosidade está relacionada à alta resistência a compressão (Xie et al. 2000).

No presente estudo não houve alteração da resistência à compressão após a adição das NPTiO<sub>2</sub> (Tabela 1). De acordo com Elsaka et al. 2011, elevadas concentrações de NP podem resultar em prejuízo dessa propriedade. As NP interferem na reação de presa do CIV, devido a falhas nas ligações cruzadas, que podem enfraquecer enfraqueceriam o material (Gu et al., 2005).

A rugosidade apresentou-se aumentada quando comparado o G2 com o GC (Tabela 1). Sabe-se que esta condição resulta no aumento de adesão bacteriana e formação de biofilmes (Mei et al., 2011).

Moshaverinia et al. (2008) demonstraram que maiores concentrações de NP melhoram a rugosidade superficial, pois há uma interação mais intensa entre as NP e o o ácido poliacrílico na superfície do CIV. Os autores citaram também que o tamanho reduzido das NP contribui para sua distribuição entre as grandes partículas de vidro do CIV, agindo como sítios adicionais de ligação para o polímero poliacrílico. Assim,

garantem maior homogeneidade da superfície.

## CONCLUSÃO

A associação do CIV com NPTiO<sub>2</sub> nas concentrações analisadas neste estudo não indicam nenhum benefício as propriedades analisadas, apresentando resultados sem diferenças estatísticas ou não favoráveis em alguns casos, sendo ainda o CIV convencional a melhor opção.

## AGRADECIMENTOS

A UNESP e CNPq pela concessão de bolsa de IC-Reitoria.  
Processo:106552/2017-1

## REFERÊNCIAS

Becci A.C.O.; Marti L.M.; Zuanon A.C.C.; Brighenti F.L.; Spolidório D.M.P.; Giro E.M.A. **Influence of the addition of chlorhexidine diacetate on bond strength of a high-viscosity glass ionomer cement to sound and artificial caries-affected dentin.** Rev Odontol UNESP, v. 43, n. 1, p. 1-7, 2014.

Bjorndal L.; Larsen T.; Thylstrup A. **A clinical and microbiological study of deep carious lesion during stepwise excavation using long treatment intervals.** Caries Res., v. 31, n. 6, 1997.

Cheng L.; Weir M.D.; Xu H.H.K.; Kraigsleyf A.M.; Lin N.J.; Lin-Gibson S.; Zhou X. **Antibacterial and physical properties of calcium-phosphate and calcium-fluoride nanocomposites with chlorhexidine.** Dent mater., v. 28, n. 5, 2012.

Deepalakshmi M.; Poorni S.; Miglani R.; Rajamani I.; Ramachandran S. **Evaluation of the antibacterial and physical properties of glass ionomer cements containing chlorhexidine and cetrinide: an in-vitro study.** Indian J Dent Res., v. 21, n. 4, 2010.

Duque C.; Negrini T.C.; Sacono N.T.; Spolidorio D.M.P.; Costa C.A.S.; Hebling J. **Clinical and microbiological performance of resin-modified glass-ionomer liners after incomplete dentine caries removal.** Clinic Oral Investig., v. 13, n. 4, 2009.

Elsaka S.E.; Hamouda I.M.; Swain M.V. **Titanium dioxide nanoparticles addition to a conventional glass-ionomer restorative: Influence on physical and antibacterial properties.** J Dent., v. 39, n.9, 2011.

Gu Y.W.; Yap A.U.; Cheang P.; Khor K.A. **Effects of incorporation of HA/ZrO(2) into glass ionomer cement (GIC).** Biomaterials. v. 26, n. 7, 2005.

Hajipour M.J.; Fromm K.M.; Ashkarran A.A.; Aberasturi D.J.; Larramendi I.R.D.; Roj T.; Serpooshan V.; Parak W.J.; Mahmoudi M. **Antibacterial properties of nanoparticles,** Trends Biotechnol. V. 30, n. 10, 2012.

Maltz M.; Oliveira E.; Fontanella V.; Bianchi R. **A clinical, microbiologic, and radiographic study of deep caries lesions after incomplete caries removal.** Quintessence Int. v. 33, n. 2, 2002.

Marti L.M.; Mata Md.; Ferraz-Santos B.; Azevedo E.R.; Giro E.M.; Zuanon A.C. **Addition of chlorhexidine gluconate to a glass ionomer cement: a study on mechanical, physical and**

**antibacterial properties.** Braz Dent J. v. 25, n. 1, 2014.

Mei L.; Bussher H.J.; van der Mei H.C.; Ren Y. **Influence of surface roughness on streptococcal adhesion forces to composite resins.** Dental Materials. 2011.

Mitchell C.A.; Douglas W.H. **Comparison of the porosity of hand-mixed and capsulated glass-ionomer luting cements.** Biomaterials. v. 18, n. 16, 1997.

Moshaverinia A.; Ansari S.; Movasaghi Z.; Billington R.W.; Darr J.A.; Rehman I.U. **Modification of conventional glass-ionomer cements with N-vinylpyrrolidone containing polyacids, nano-hydroxy and fluoroapatite to improve mechanical properties.** Dental Material., 2008.

Moshaverina M.; Borzabadi-Farahani A.; Sameni A.; Moshaverina A.; Ansari S. **Effects of incorporation of nano-fluorapatite particles on microhardness, fluoride releasing properties, and biocompatibility of a conventional glass ionomer cement (GIC).** Dent Mater J., v. 35, n. 5, 2016.

Prentice L.H.; Tyas M.J.; Burrow M.F. **The effect of ytterbium fluoride and barium sulphate nanoparticles on the reactivity and strength of a glass-ionomer cement.** Dent Mater., v. 22, n. 8, 2006.

Setchell D.J.; Teo C.K.; Khun A.T. **The relative solubilities of four modern glassionomer cements.** Br Dent J., 1985 .

Spencer C.G.; Campbell P.M.; Buschang P.H.; Cai J.; Honeyman A.L. **Antimicrobial effects of zinc oxide in an orthodontic bonding agent.** Angle Orthod., v. 79, n. 2, 2009.

Takahashi Y.; Imazato S.; Kaneshiro A.V.; Ebisu S.; Frencken J.E.; Tay F.R. **Antibacterial effects and physical properties of glass-ionomer cements containing chlorhexidine for the ART approach.** Dent Mater., v. 22, n. 7, 2006.

Tüzüner T.; Kuşgöz A.; Er K.; Taşdemir T.; Buruk K.; Kemer B. **Antibacterial activity and physical properties of conventional glass-ionomer cements containing chlorhexidine diacetate/cetrimide mixtures.** J Esthet Restor Dent., v. 23, n.1, 2011.

Xie D.; Brantley W.A.; Culbertson B.M.; Wang G. **Mechanical properties and microstructures of glass-ionomer cements.** Dent Mater., v. 16, n. 2, 2000.

## PURIFICATION OF A XYLANASE FROM *Penicillium crustosum* AND ITS POTENTIAL USE IN CLARIFYING FRUIT JUICE

### **Jaina Caroline Lunkes**

State University of Western Paraná, Center for Medical and Pharmaceutical Sciences, Cascavel - Paraná, Brazil

### **Vanessa Cristina Arfelli**

State University of Western Paraná, Center for Medical and Pharmaceutical Sciences, Cascavel - Paraná, Brazil

### **Jorge William Fischdick Bittencourt**

State University of Western Paraná, Center for Medical and Pharmaceutical Sciences, Cascavel - Paraná, Brazil

### **Rafael Andrade Menolli**

State University of Western Paraná, Center for Medical and Pharmaceutical Sciences, Cascavel - Paraná, Brazil

### **Alexandre Maller**

State University of Western Paraná, Center for Medical and Pharmaceutical Sciences, Cascavel - Paraná, Brazil

### **Jose Luís da Conceição Silva**

State University of Western Paraná, Center for Medical and Pharmaceutical Sciences, Cascavel - Paraná, Brazil

### **Rita de Cássia Garcia Simão**

State University of Western Paraná, Center for Medical and Pharmaceutical Sciences, Cascavel - Paraná, Brazil

### **Marina Kimiko Kadowaki**

State University of Western Paraná, Center for Medical and Pharmaceutical Sciences, Cascavel - Paraná, Brazil

**ABSTRACT:** Xylan-degrading enzymes have been used in several industrial sectors, such as in pulp and paper processing, brewing, baking, animal feed, starch, textiles and wine production. This study aimed to purify an extracellular xylanase produced by *Penicillium crustosum* and investigate its potential for fruit juice clarification. The enzyme was purified after three chromatography columns (DEAE, CM-Sephadex, and Sephadex G-75), and it exhibited 23.4 kDa of molecular mass. The purified xylanase-I hydrolyzed the beechwood xylan and yield mainly xylobiose and xylotriose as end products. Furthermore, xylanase-I showed no cytotoxic effects and exhibited a significant increase in the clarification of mango, orange, strawberry, peach, apple, and papaya juices. This is also first report on the potential of a xylanase produced from *Penicillium crustosum* isolated from the Atlantic Forest that showed promising characteristics for biotechnological application.

**KEYWORDS:** endoxylanase, fruit juice, filamentous fungi, *Penicillium*.

### 1 | INTRODUCTION

Xylan is a heterogeneous polysaccharide that consists of a backbone of xylose residues linked by  $\beta$ -1,4 bonds with short lateral branches (BAJAJ AND MANHAS, 2012). The

most common substituents that comprise the side branches are arabinosyl, mannosyl, galactosyl, acetyl, and glucuronosyl, which are found in polymers such as arabinoxylans, glucomannans, arabinogalactans, glucuronoxylans, galactoglucomannans, and arabinoglucuronoxylans (HEINEN, BETINI and POLIZELI, 2017). Xylan is a major component of hemicellulose and the second-most abundant polysaccharide in nature (COLLINS, GERDAY and FELLER, 2005). However, the complexity of the structure of xylan requires the action of a group of enzymes for complete hydrolysis (BEG et al., 2001). These enzymes are known as endoxylanase (EC 3.2.1.8),  $\beta$ -xylosidase (EC 3.2.1.37), acetylxylan esterase (EC 3.1.1.72),  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55),  $\alpha$ -D-glucuronidase (EC 3.2.1.139), feruloyl esterase (EC 3.1.1.73), and p-coumaroyl esterase (EC 3.1.1.B10) (CHÁVEZ, BULL & EYZAGUIRRE, 2006). Endoxylanases are responsible for cleavage of the  $\beta$ -1,4 glycosidic linkages of the xylan backbone, releasing xyloligoosaccharides (KOCABAS et al., 2015).

Several organisms found in nature, including bacteria, protozoa, algae, and fungi, are producers of xylanase (COLLINS, GERDAY and FELLER, 2005). Among the microorganisms, fungi present as potential producers of large-scale biocatalysts because of their ability to secrete enzymes (HEINEN, BETINI and POLIZELI, 2017; KOCABAS et al., 2015). In recent decades, interest in microbial xylanases has increased because of their potential in biotechnology, and they have been used in various industrial sectors, including the following: supplementation of feed for monogastric animals, pre-bleaching of pulp and paper, saccharification of lignocellulosic biomass, textiles, and baking (HEINEN et al., 2018). Furthermore, xylan-degrading enzymes, together with cellulase, amylase, and pectinase, have been used in the stabilization of fruit pulp; recovery of flavors, essential oils, vitamins, minerals, pigments, and edible coloring; reduction in viscosity; and liquefaction of fruits and vegetables (HEINEN, BETINI and POLIZELI, 2017; DOBREV et al., 2007). Studies have shown that the addition of enzymes in fruit juice and wine provides improvement in quality and characteristics by clarifying these products (BAJAJ & MANHAS, 2012). Xylanases have been used to improve filtration and to reduce the turbidity of the final product (DOBREV et al., 2007). Thus, this study aimed to purify an extracellular xylanase produced by *Penicillium crustosum*, isolated from the Atlantic forest biome of Brazil, and to analyze the performance of xylanase in the clarification of fruit juice.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Fungus and Culture Conditions

The fungus *P. crustosum* was previously isolated from the Atlantic forest in Paraná-Brazil. The sequence of ITS1 - ITS4 of the fungus can be found in the database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) by GenBank accession number **KM065878** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The fungus strain was cultivated in potato-

dextrose-agar (PDA) at 28°C for seven days, and after its growth, maintained at 4°C. The liquid cultures for xylanase production were optimized previously as reported by Silva et al., 2016. The cultures were incubated at 28 °C under static condition for six days, and the crude extract was obtained by vacuum-filtered. The filtrate was centrifuged at 1200 x *g* for 10 min, and the supernatant was used to determine enzymatic activity and purification.

## 2.2 Enzymatic Assay and Protein Quantification

Xylanase was determined based on the amount of reducing sugar released after incubation in adequately diluted enzyme solution containing 1% (w/v) beechwood xylan, in a 50 mM acetate buffer (pH 5.0) at 50°C for 10 min. The amount of reducing sugar was determined using the dinitrosalicylic acid method (MILLER, 1959). One unit of enzymatic activity was defined as the amount of enzyme capable of releasing 1  $\mu$ mol of reducing sugar per minute under the experimental conditions. All assays were performed in triplicate.

The amount of protein was estimated by Bradford (1976) method using bovine serum albumin as standard, and an absorbance of 280 nm was used for monitoring the protein in the column eluates.

## 2.3 Purification of Xylanase

The crude extract from *P. crustosum* was loaded to the ion exchange column DEAE-Sephadex (2 x 20 cm), pre-equilibrated with Tris-HCl buffer (0.02 M, pH 7.5). A 5 mL fraction in a flow of 1.3 mL/min using the same buffer for elution was collected. The fractions of the first peak with xylanolytic activity unbound in the DEAE-Sephadex column were pooled, dialyzed, and loaded to a second ion exchange column of CM-Sephadex (2 x 20 cm), pre-equilibrated with 0.02 M of sodium acetate buffer, at pH 5.0. Elution was performed with the same buffer added of linear NaCl gradient from 0.05 to 1.0 M. Fractions with enzyme activity were pooled, dialyzed and concentrated by lyophilization, and loaded to the Sephadex G-75 column (2 x 70 cm) pre-equilibrated with a 0.02 M sodium acetate buffer, at pH 5.0. Fractions with enzyme activity were pooled, dialyzed, and concentrated by lyophilization for further analysis of the properties of the enzyme.

## 2.4 SDS-PAGE and Zymogram

The purity of the enzyme was verified by both electrophoresis native-PAGE and denaturing conditions (SDS-PAGE) at a concentration of 10% acrylamide, according to Laemmli (1970). The gels were silver-stained according to Blum, Beier and Gros (1988), and the molecular weight ladder was as follows: phosphorylase B (97 kDa), albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (21.1 kDa), and  $\alpha$ -lactalbumin (14.1 kDa). Native-PAGE (10%) of the sample was carried out to obtain the zymogram using the methodology described by Reisfeld,



Lewis and Williams (1962). After electrophoresis, the gel was incubated for 30 min in 0.5% Triton X-100. After being washed with distilled water, the gel was incubated with 1% beechwood xylan (w/v) in 0.05 M sodium acetate buffer, at pH 5.0, for 30 min in a water bath at 50 °C and then stained with Congo Red (0.2%) for 10 min, and washed with 1 M NaCl to remove excess dye.

## 2.5 Thin-Layer Chromatography (TLC) Analysis of the Hydrolytic Products

The enzymatic hydrolysis of beechwood xylan was performed by incubating the beechwood xylan 1% with purified enzyme under the standard assay condition. Aliquots were collected at different time points (30, 60, 120, and 160 min), and products were analyzed by thin-layer chromatography (TLC). Thin-layer chromatography was developed using n-butanol:pyridine:water (7:3:1, v/v/v) as the mobile phase, and xylose, xylobiose, and xylotriose as standards. The hydrolysis products were detected by spraying with a 1:1 (v/v) mixture of 0.4% (w/v) orcinol in sulfuric acid/methanol (1:9, v/v) followed by heating at 100 °C.

## 2.6 Macrophage Isolation and Measurement of Cell Viability

Albino Swiss mice (eight weeks old) were used as peritoneal macrophage donors. All legal recommendations of Brazilian legislation (Law No. 6.638, Nov. 5, 1979) for animal-handling procedures for scientific research were approved by the Animal Ethics Committee. Mouse peritoneal macrophages were collected by infusing the donors' peritoneal cavities with 10 mL of chilled phosphate-buffered saline (PBS). The cells were plated in culture medium (RPMI-1640, 5% fetal bovine serum, and antibiotic) in 96-well plates ( $2 \times 10^5$  cells/well). After 2 h of incubation at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator, non-adherent cells were removed by washed twice with PBS at 37°C (NOLETO et al., 2002).

Adherent macrophages were incubated for 48 h in the standard medium in the absence (control) or presence of purified xylanase (5 U mL<sup>-1</sup> or 12.38 µg of protein) or crude extract (274.5 µg of protein) from *P. crustosum*. Cytotoxicity was evaluated using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tetrazolium reduction assay at 550 nm in a spectrophotometer, as described by Reilly et al., (1998). The significance of the differences between the means was calculated by one-way ANOVA with Dunnet's multiple comparison tests using [GraphPad Prism](#) 5.0 at a value of  $p < 0.05$ .

## 2.7 Effect of Xylanase-I on Clarification of Fruit Juice

Two hundred grams of fruits (apple, kiwi, mango, melon, orange, papaya, peach, pear, plum, and strawberry) previously washed with distilled water and cut into cubes were ground in a blender with 200 mL of distilled water; then the juice was filtered in sterile gauze. The mixture of 3 mL of each juice and *P. crustosum* xylanase (5 U

mL<sup>-1</sup>) was incubated at 50°C according to the modified method of Bajaj and Manhas (2012). After 10 min, the reaction was stopped by boiling at 100°C for 1 min followed by centrifugation at 3000 x *g* for 10 min. The turbidity in the supernatant of fruit juice was determined by a spectrophotometer at 600 nm. The control was conducted under the same conditions, except that the enzyme was replaced by deionized H<sub>2</sub>O. Results are presented as means ± mean standard error (SEM), and the significance of the differences between the means was calculated by two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison tests using GraphPad Prism 5.0, in which *p*<0.01 was considered to represent significance differences.

### 3 | RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Purification of Xylanase-I from *P. crustosum*

The crude extract was loaded onto the ion-exchange DEAE-Sephadex, and two enzymatic activity peaks were obtained (Figure 1A). The first peak with xylanase-I unbound to resin was loaded onto the CM-Sephadex column and eluted with a NaCl gradient of 100 mM and 275 mM (Figure 1B). The presence of more than one xylanase produced by *Penicillium* fungi has also been described by Chávez, Bull and Eyzaguirre (2006). After enzyme eluting from the size exclusion column Sephadex G-75 (Figure 1C), xylanase-I was purified, with recovery of 0.06% and a 22.18 purification fold (Table 1). Liao and colleagues (2014) used three steps of purification of xylanase from *Penicillium oxalicum* GZ-2; however, recovery was 6.9% with a 6.4 purification fold. Knob and colleagues (2013) reported recovery of 76.94% and a 5.10-fold with purified xylanase from *Penicillium glabrum*. The homogeneity of the xylanase purified by column chromatography was confirmed by a single band found in SDS-PAGE, and the molecular mass was 23.4 kDa (Figure 1D). The molecular mass of xylanase-I *P. crustosum* was near those of *Penicillium* genera xylanases, such as the xylanase from *P. oxalicum*, with molecular mass of 21.3 kDa (LIAO et al., 2014).

Steps	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U mg <sup>-1</sup> )	Purification (fold)	Yield (%)
Crude culture filtrate	420	7,650	18.21	1	100
DEAE-Sephadex	19.02	1,104	58.04	3.18	4.52
CM-Sephadex	2.25	818	391.55	21.50	0.53
Sephadex-G75	0.255	103	403.92	22.18	0.06

TABLE 1: Summary of purification steps of xylanase-I from *P. crustosum*

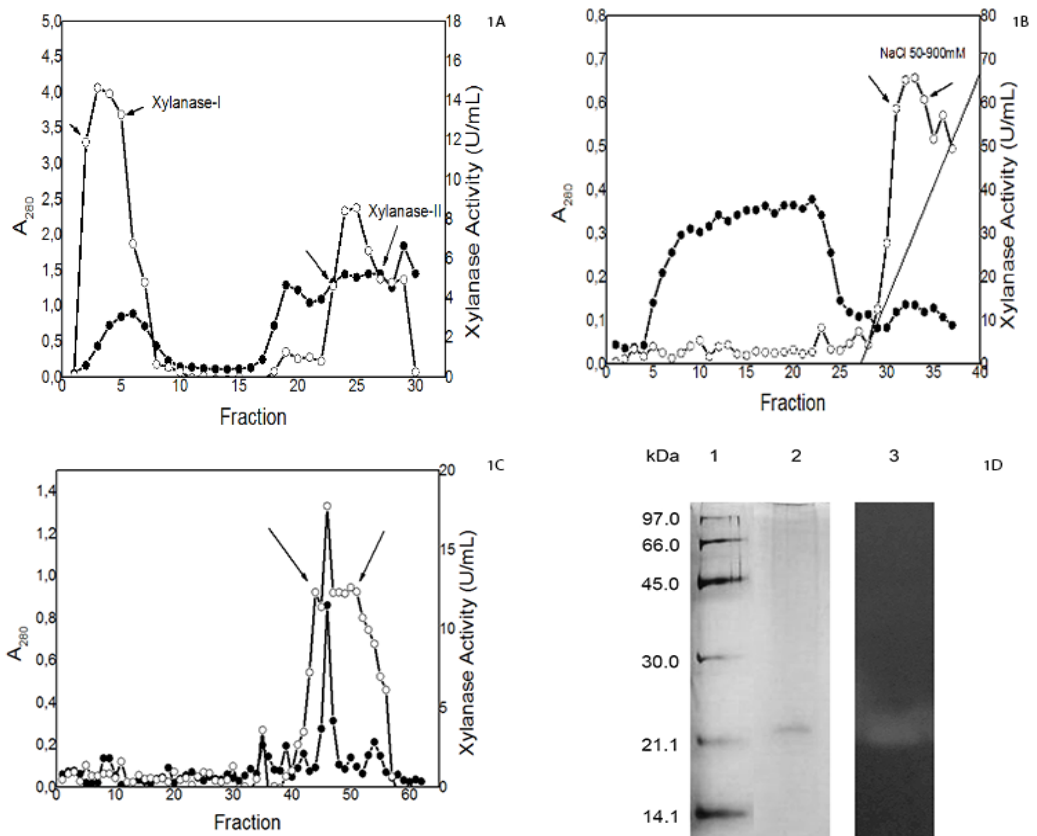


FIGURE 1: Chromatographic profile of purification of xylanase-I from *P. crustosum* by DEAE-Sephadex (A), CM-Sephadex (B), and gel filtration Sephadex G-75 (C); Xylanase activity (o), protein absorbance at 280 nm (●), and NaCl (straight line). The collected fractions are indicated by arrows (à); SDS-PAGE gel electrophoresis (D). Lane 1: molecular weight ladder with phosphorylase b (97 kDa), albumin (66 kDa), ovoalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa), and  $\alpha$ -lactalbumin (14.4 kDa); Lane 2: purified xylanase from *P. crustosum*; Lane 3: zymogram by native PAGE.

### 3.2 Hydrolysis of Xylan

The mode of action of the purified xylanase-I was shown by TLC analysis of hydrolysates of beechwood xylan. After 160 min incubation, no xylose was produced, but xylobiose and xylotriose were the main hydrolysis products of beechwood, indicating that it is a typical endo-acting xylanase (Figure 2).

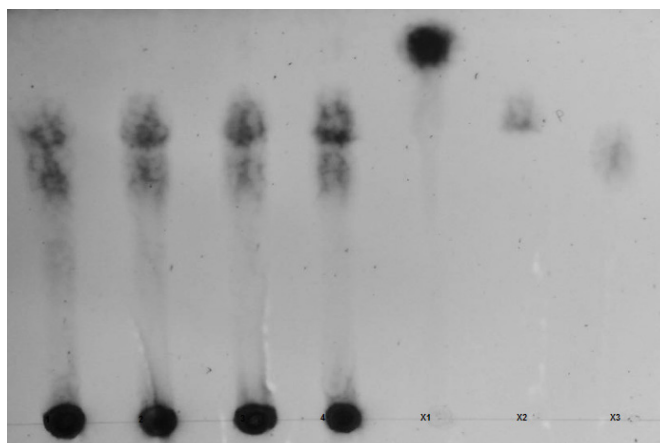


FIGURE 2: TLC analysis of the products after hydrolysis of beechwood xylan by xylanase-I from *P. crustosum*. The numbers 1, 2, 3, and 4 represent aliquots that were removed at times 30, 60, 90, and 120 min, respectively.

120, and 160 min, respectively. X1 (xylose), X2 (xylobiose), and X3 (xylotriose) were used as standards.

### 3.3 Cytotoxicity Analysis of the Crude Extract and Purified Xylanase-I from *P. crustosum*

Considering the application of the enzyme in different sectors of the food industry, the cytotoxic effects of both crude extract and purified xylanase-I from *P. crustosum* were analyzed using the cell viability of mouse macrophage. Both crude extract and purified xylanase-I from *P. crustosum* showed no cytotoxic effects, that is, they did not cause cell death of mice macrophages at the concentration tested (5 U mL<sup>-1</sup> or 12.38 µg of protein). The statistical analysis also showed that there is no significant difference between the control and the samples (Figure 3), suggesting that crude extract and purified xylanase-I enzyme from *P. crustosum* are safe and can be added as a supplement to food products.

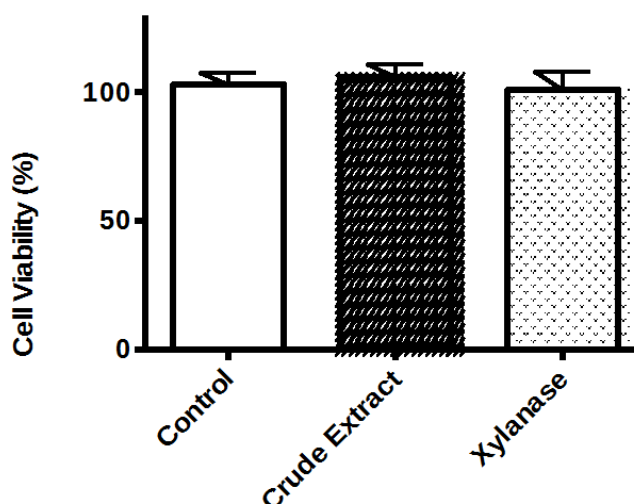


FIGURE 3: Effect of crude extract and purified xylanase-I from *P. crustosum* on cell viability. Differences were considered significant at a value of  $p < 0.05$  compared with control.

### 3.4 Effect of Xylanase-I on Clarification of Fruit Juice

The clarification of ten different types of fruit juices (apple, kiwi, mango, melon, orange, papaya, peach, pear, plum, and strawberry) by adding 5 U mL<sup>-1</sup> xylanase-I from *P. crustosum* for 10 min was analyzed (Figure 4). Six types of juices showed a significant increase in clarification, in the following order: mango (36.68%), orange (29.89%), strawberry (28.89%), and peach (28.29%), with lower values for apple (17.77%) and papaya (18.45%). The other types of juice (plum, kiwi, melon, and pear) did not exhibit significant clarification with xylanase-I. Fruit juice treated with xylanase was clarified because of the hydrolysis of xylan that is present in these juices. According to Bajaj & Manhas (2012), the turbidity and viscosity of the raw juice are mainly because of the polysaccharides such as pectin, starch, and hemicellulosic components. However, treatment with enzymes that degrade polymers such as hemicellulose, pectin, and

cellulose improve the extraction of some compounds like sugars, and further it clarifies the juice (DHIMAN et al., 2011; SHARMA & KUMAR, 2013). The enzymes used by industry for the clarification of juice, beer, and wine are primarily composed of enzyme cocktails, including hemicellulases to improve juice clarification (YANG et al., 2011). Similar reports of improvement in the clarification of citrus juice have been described for xylanases from *Bacillus stearothermophilus* (DHIMAN et al., 2011) and for *Bacillus licheniformis* xylanase added to pineapple, mousambi, and apple juices (BAJAN & MANHAS, 2012).

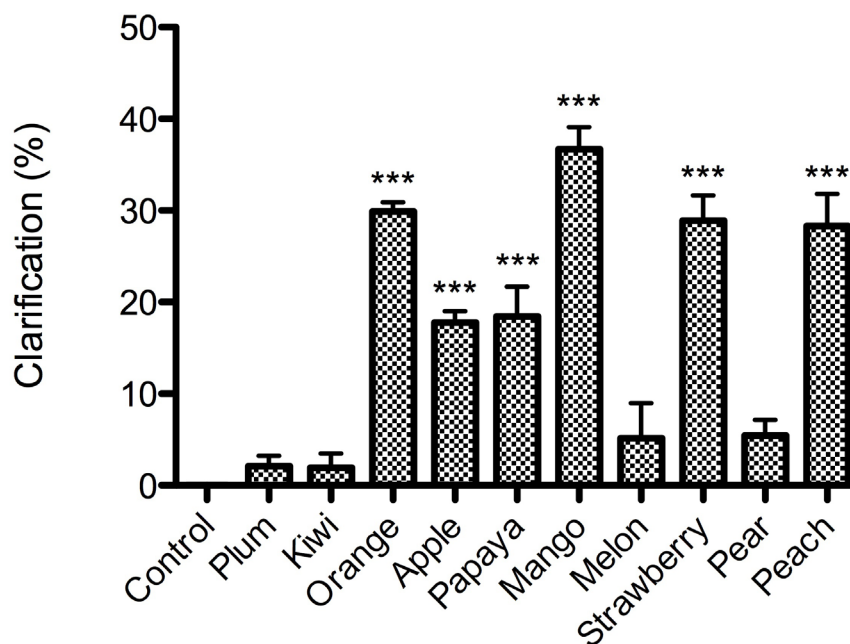


FIGURE 4: Effect of xylanase-I on clarification of fruit juice. The bars represent means  $\pm$  SEM and \*\*\* $p < 0.01$  denotes significant differences compared with control.

#### 4 | CONCLUSION

The purified endoxylanase from *P. crustosum* showed promising and desirable characteristics for biotechnological applications. The clarification of mango, orange, strawberry, peach, apple, and papaya juices was significantly improved with the addition of xylanase-I from *P. crustosum*. To our knowledge, this is the first report on the potential application of a xylanase produced by *Penicillium crustosum* fungus.

#### ACKNOWLEDGMENTS

Jaina C. Lunkes and Vanessa C. Arfelli were supported by fellowship of the Fundação Araucária-Brazil, and Jorge W. F. Bittencourt was supported by fellowship from the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES).

## REFERENCES

- BAJAJ, B. K., MANHAS, K. **Production and characterization of xylanase from *Bacillus licheniformis* P11(C) with potential for fruit juice and bakery industry.** Biocatal Agric Biotechnol, v. 1, p. 330-337, 2012.
- BEG, Q.; KAPOOR, M.; MAHAJAN L.; HOONDAL, G. S. **Microbial xylanases and their industrial applications: a review.** Appl Microbiol Biotechnol, v. 56, p. 326-338, 2001.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROS, H. J. **Improved silver staining of plants proteins, RNA and DNA im polyacrilamides gels.** Eletrophoresis, v. 81, p. 93-99, 1988.
- BRADFORD, M. M. A. **Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Anal Biochem, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CHÁVEZ, R., BULL, P., EYZAGUIRRE, J. **The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*.** J Biotechnol, v. 123, p. 413-433, 2006.
- COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. **Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases.** FEMS Microbiol Rev, v. 29, p. 3-23, 2005.
- DHIMAN, S. S.; GARG, G.; SHARMA, J.; MAHAJAN, R.; METHOXY. **Characterization of statistically produced xylanase for enrichment of fruit juice clarification process.** N Biotechnol, v. 28, p. 746-755, 2011.
- DOBREV, G. T.; PISHTIYSKI, I. G.; STANCHEV, V. S.; MIRCHEVA, R. **Optimization of nutrient medium containing agricultural wastes for xylanase production by *Aspergillus niger* B03 using optimal composite experimental design.** Bioresour Technol, v. 98, p. 2671-2678, 2007.
- HEINEN, P.R.; BAUERMEISTER, A.; RIBEIRO, L.F.; MESSIAS, J.M.; ALMEIDA, P.Z.; MORAES, L.A.B.; VARGAS-RECHIA, C.G.; DE OLIVEIRA, A.H.C.; WARD, R.J.; FILHO, E.X.F.; KADOWAKI, M.K.; JORGE, J.A.; POLIZELI, M.L.T.M. **GH11 xylanase from *Aspergillus tamaritii* Kita: Purification by one – step chromatography and xylooligosaccharides hydrolysis monitored in real-time by mass spectrometry.** Int J Biol Macromol, v.108, p. 291-299, 2018.
- HEINEN, P.R.; BETINI, J.H.A.; POLIZELI, M.L.T.M. **Xylanases**, in: Reference Module in Life Sciences, Elsevier, p. 1-12, 2017.
- KNOB, A.; BEITEL, S. M.; FORTKAMP, D.; TERRASAN, C. R. F.; ALMEIDA, A. F. **Production, purification, and characterization of a major *Penicillium glabrum* xylanase using brewer's spent grain as substrate.** BioMed Res Int, p. 1-8, 2013.
- KOCABAS, D. S.; GÜDER, S.; ÖZBEN, N. **Purification strategies and properties of a low-molecular weight xylanase and its application in agricultural waste biomass hydrolysis.** J Mol Catal B: Enzym, v. 115, p. 66-75, 2015.
- LAEMMLI, U.K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LIAO, H.; SUN, S.; WANG, P.; BI, W.; TAN, S.; WEI, Z.; MEI, X.; LIU, D.; RAZA, W.; SHEN, Q.; XU, Y. **A new acidophilic endo- $\beta$ -1,4-xylanase from *Penicillium oxalicum*: cloning, purification, and insights into the influence of metal ions on xylanase activity.** J Ind Microbiol Biotechnol, v. 41, p. 1071-1083, 2014.
- MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar.** Anal Chem, v. 31, p. 424-426, 1959.



NOLETO G. R., MERCÊ A. L. R., IACOMINI M., GORIN P. A. J., THOMAZ-SOCCOL V., OLIVEIRA M. B. M. **Effects of a lichen galactomannan and its vanadyl (IV) complex on peritoneal macrophages and leishmanicidal activity.** Mol Cell Biochem. v. 233, p. 73-82, 2002.

REILLY, T. P., BELLEVUE F. H., WOSTER P. M., SVENSSON C. K. **Comparison of the *in vitro* cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone.** Biochem Pharmacol, v. 55, p. 803-810, 1998.

REISFELD, R. A., LEWIS, U. J. & WILLIAMS, D. E. **Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels.** Nature, v. 3, p. 195-281, 1962.

SHARMA, M.; KUMAR, A. **Xylanases: na overview.** Brit Biotechnol J, v. 3, p. 1-28, 2013.

SILVA, N.F.S., SIMÕES, M.R., KNOB, A., MORAES, S.S., HENN, C., SILVA, J.L.C., SIMÃO, R.C.G., MALLER, A., KADOWAKI, M.K. **Improvement in the bleaching of kraft pulp with xylanase from FP 11 isolated from the Atlantic forest.** Biocatal. Biotransfor, Early Online, p. 1-9, 2016.

YANG, J.; LUO, H.; LI, J.; WANG, K.; CHENG, H.; BAI, Y.; YUAN, T.; FAN, Y.; YAO, B. **Cloning, expression and characterization of an acidic endo-polygalacturonase from *Bispora* sp. MEY-1 and its potential application in juice clarification.** Process Biochem, v. 46, p. 272-277, 2011.

## SENSIBILIDADE CELULAR E DE BIOFILME DE *Enterococcus* sp. AOS DESINFETANTES DE USO INDUSTRIAL

**Luciana Furlaneto Maia**  
**Naieli Mücke**  
**Márcia Regina Terra**  
**Danielle Karine Ohashi**  
**Talita Butzke Bússolo**  
**Márcia Cristina Furlaneto**

**RESUMO:** *Enterococcus* sp. podem ser isolados de seres humanos, diversos animais e ambiente; possui alta tolerância a fatores extremos como pH, temperatura e concentração salina. É crescente seu potencial como agentes causadores de sérias infecções, podendo adquirir alta resistência a antimicrobianos e biocidas. Os equipamentos na indústria alimentícia estão propensos à alta contaminação microbiológica devido à presença de substratos para os microrganismos, e quando não higienizados permitem que estes se desenvolvam e formem biofilmes, contaminando o produto final. Este estudo teve por finalidade analisar a sensibilidade de isolados de *Enterococcus* sp provenientes de equipamentos processos de embutidos cárneos cozidos a 5 diferentes desinfetantes de uso industrial. Foram testados a sensibilidade de células planctônicas e em biofilme quando estes estavam suspensos em matéria orgânica e água. Ao avaliar a ação de sanitizantes sobre células de *Enterococcus* sp. na presença de água verificou-se que nenhum

produto utilizado conseguiu ser totalmente eficiente no controle do desenvolvimento dos enterococos. Já nos testes utilizando BHI e sanitizante, os isolados apresentaram menor desenvolvimento somente na presença de espumante alcalino. O maior desenvolvimento microbiano ocorreu na presença dos produtos dióxido de cloro, hipoclorito de sódio, quartenário de amônia e ácido peracético. Observamos que independente do tipo de sanitizantes e biofilme formado, nenhum agente químico foi eficaz na eliminação total das células de *Enterococcus*. Indispensável ressaltar que os resultados confirmam a importância de ações preventivas nas indústrias para evitar a resistência dos micro-organismos a determinados compostos e maximizar a eficiência dos procedimentos de higienização aplicados.

**PALAVRAS-CHAVE:** Enterococci. Planctônicas. Resistência.

### CELL AND BIOFILME SENSITIVITY OF *Enterococcus* sp. TO INDUSTRIAL USE DISINFECTANTS

**ABSTRACT:** *Enterococcus* sp. can be isolated from humans, various animals and the environment; has high tolerance to extreme factors like pH, temperature and saline concentration. It is increasing its potential as

agents causing serious infections, being able to acquire high resistance to antimicrobials and biocides. The equipment in the food industry is prone to high microbiological contamination due to the presence of substrates for the microorganisms, and when unhygienic they allow them to develop and form biofilms, contaminating the final product. The aim of this study was to analyze the sensitivity of *Enterococcus* sp isolates from meat cooked sausage processes to 5 different disinfectants for industrial use. The sensitivity of planktonic and biofilm cells were tested when they were suspended in organic matter and water. When evaluating the action of sanitizers on *Enterococcus* sp. in the presence of water it was verified that no product used could be totally efficient in controlling the development of enterococci. In the tests using BHI and sanitizing, the isolates showed less development only in the presence of alkaline foaming. The greatest microbial development occurred in the presence of the products chlorine dioxide, sodium hypochlorite, quaternary ammonia and peracetic acid. We observed that regardless of the type of sanitizers and biofilm formed, no chemical agent was effective in total elimination of *Enterococcus* cells. It is important to emphasize that the results confirm the importance of preventive actions in the industries to avoid the resistance of the microorganisms to certain compounds and to maximize the efficiency of the hygienic procedures applied.

Keywords: Enterococci. Planktonic. Resistance.

## 1 | INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Enterococcus* são descritas como produtoras de L-ácido láctico, homofermentativas, gram-positivas, catalase negativa, anaeróbicas facultativas, produzem ácido L-láctico a partir de hexoses e se diferem dos demais cocos homofermentadores por apresentarem crescimento a 10 e 45°C, a pH 9,6, em presença de até 6,5% de NaCl e 40% de sais biliares (FRANZ, et al., 2003). Mais de 54 espécies de *Enterococcus* são descritas, porém as espécies *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. hirae* são as mais frequentemente encontradas devido à ampla distribuição no meio ambiente (EUZÉBY, 2015).

Os enterococos são bactérias comensais que colonizam o trato digestório de uma ampla gama de hospedeiros vertebrados e, portanto, difundida no meio ambiente (FISHER; PHILLIPS, 2009). São consideradas bactérias autóctones, uma vez que liberadas no meio ambiente são capazes de colonizar diversos nichos, além de possuir capacidade de resistir e de se multiplicar em condições ambientais hostis, com grande potencial para contaminar águas e alimentos (IVERSEN et al., 2002).

Algumas espécies, incluindo os *E. faecalis* e *E. faecium* estão entre os mais importantes microrganismos adquiridos em ambiente hospitalar, são multirresistentes e podem causar infecções graves na corrente sanguínea, do trato urinário, da pele e dos tecidos moles (ARIAS; MURRAY, 2012). Os enterococos são também aceitos como indicadores de contaminação fecal para as águas de recreação (USEPA, 2002),

e têm sido empregados como indicadores de qualidade microbiológica de produtos frescos (JOHNSTON et al., 2006).

Dentre os fatores de virulência deste gênero, destaca-se a capacidade de formar biofilme em superfícies bióticas e abióticas. Os biofilmes microbianos são comunidades constituídas por células sésseis, mono ou multiespécies, aderidas a um substrato, embebidas em uma matriz de EPS, em cuja formação os micro-organismos exibem diferenciados fenótipos, metabolismo, fisiologia e transcrição genética (DONLAN; COSTERTON, 2002). Como etapas importantes para a sua formação, são descritas as adesões iniciais, passando os micro-organismos de seu estilo de vida planctônico ao sésseis, à formação de microlônias, à maturação e ao destacamento de células do biofilme, retornando estas a seu estilo de vida planctônico.

A formação de biofilme ocorre em variados tipos de ambientes bióticos ou abióticos. Pesquisas sobre a sua formação em superfícies utilizadas na produção de alimentos vêm recebendo destaque, principalmente no que se refere aos malefícios de sua presença. Uma vez constituídos, os biofilmes agem como pontos de contaminação constante, liberando células de micro-organismos patogênicos e/ou deterioradores de alimentos, podendo comprometer a qualidade microbiológica de matérias-primas, produtos pré-acabados e acabados (BERESFORD; ANDREW; SHAMA, 2001; CHEN et al., 2007; FUSTER-VALLS et al., 2008; MANSFELD, 2007).

Outra problemática envolvendo a formação de biofilme na indústria de alimentos é a capacidade das células sésseis serem resistentes aos agentes empregados nos procedimentos de higienização. Alguns pesquisadores relatam que as células sésseis chegam a ser de 500 a 1000 vezes mais resistentes que as células planctônicas (FUSTER-VALLS, 2008). Um dos grandes responsáveis por conferir esta proteção é a matriz de EPS, que age como barreira física, impedindo que os agentes sanitizantes cheguem a seus sítios de ação. O EPS é também capaz de adsorver cátions, metais e toxinas, conferir proteção contra radiações UV, alterações de pH, choques osmóticos e dessecação. Devido a este agravante, conhecer as condições que propiciam a formação de biofilme e as suas fragilidades é primordial para que estratégias de controle, mais econômicas e eficazes, sejam dimensionadas para a eliminação de mais esta possibilidade de introdução de micro-organismos na cadeia alimentar (HERRERA et al., 2007).

Nos alimentos, os *Enterococcus* sp. podem ser encontrados em carnes, legumes, leite e produtos fermentados como os queijos, nos quais desenvolvem um importante papel no processo de maturação e enriquecimento do sabor. Algumas espécies de enterococos são utilizadas na manufatura de alimentos, porém a falta de conhecimento sobre seus fatores de virulência gera insegurança na utilização de cepas deste gênero como culturas fermentadoras e probióticas (GIRAFFA, 2003; FOULQUIÉ-MORENO et al., 2006).

As atividades prejudiciais dos enterococos estão associadas com a deterioração de alimentos e a capacidade de causar doença nos seres humanos. Ainda, em produtos

acabados pode ser considerado como indicador de contaminação fecal (STILES; HOLZAPFEL, 1997). Frequentemente presentes em leite, as bactérias do gênero *Enterococcus* podem contaminá-lo de diversas maneiras, por contato direto com fezes de animais ou por contato indireto através de água contaminada, ar ambiente, pelo de animal ou equipamentos de ordenha e armazenamento (GELSOMINO et al., 2001).

Um dos elementos cruciais para o processamento de alimentos atual é a segurança dos produtos, evitando inclusive a perda de produção e, principalmente, a perda de confiança dos consumidores (DONK et al., 2004). Podemos destacar entre os principais sanitizantes utilizados na indústria de alimentos o ácido peracético, cloraminas orgânicas, clorexidina, compostos de amônia quaternária, dióxido de cloro, hipoclorito de sódio, iodóforos e o peróxido de hidrogênio (ANDRADE; PINTO; ROSADO, 2008).

A utilização incorreta dos sanitizantes, em concentrações inadequadas, pode promover a seleção de algumas espécies bacterianas resistentes (GRAM et al., 2007). Pereira et al., (2000) indicam ainda como interferentes na adesão ligados a topografia da superfície, a composição, rugosidade e porosidade. Os equipamentos e utensílios a serem utilizados durante o processamento de alimentos devem ser desenhados, construídos e instalados de forma adequada, para que se possa assegurar a higiene e permitir à fácil e completa limpeza e sanitização (BRASIL, 1997). Russel (1992) afirma ainda que a temperatura e tempo de contato, a concentração do produto, os resíduos da superfície, o pH, as propriedades físico-químicas da água e substâncias de inativação, especialmente a matéria orgânica podem influenciar na ação dos produtos sanitizantes.

Em relação ao biofilme bacteriano, o sistema de comunicação célula-célula (*quorum sensing* - QS) tem tido grande importância científica, pois nesse sistema as bactérias sintetizam compostos sinalizadores de baixo peso molecular, denominados de autoindutores (AIs), que irão modular e influenciar a formação do biofilme, modulando também outras funções como esporulação, produção de bacteriocinas, expressão de fatores de virulência, produção de proteases e pigmentação, além de favorecer o acesso a nutrientes (VIANA, 2006).

CASTRO (2012) ao avaliar a eficiência dos sanitizantes hipoclorito de sódio, ácido peracético, e clorexidina sobre a formação de biofilme de *E. faecium*, *E. faecalis*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa* e pela interação destes, em superfície de aço inoxidável, a 25 °C por três dias de armazenamento observou que houve a redução na contagem dos biofilmes formados por *E. faecium*, *E. faecalis*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, porém estes não foram completamente eliminados. Jessen e Lammert (2003) explicam que a remoção de microrganismos de superfícies de contato torna-se muito mais complicada após a formação do biofilme, sendo mais eficiente adotar várias ações combinadas.

Em suma, após a formação do biofilme, os microrganismos que se encontram em seu interior da estrutura são protegidos da remoção quando expostos ao escoamento

de líquidos, alta turbulência e à ação de agentes químicos como os utilizados nos procedimentos de higienização (CLONTZ, 2008), tornando-se portanto, resistentes ao sanitizante.

Neste sentido, este trabalho avaliou a sensibilidade de células planctônicas e de biofilme de *Enterococcus* sp, frente a diversos sanitizantes químicos utilizados na indústria alimentícia.

## 2 | PROCEDIMENTO METODOLOGICO

### 2.1 Isolamento de *Enterococcus* sp.

O isolamento de *Enterococcus* sp. realizou-se através de suabe a partir de equipamentos envolvidos no processamento de embutidos cárneos cozidos. O suabe foi semeado na superfície de ágar canamicina esculina azida (KEA-Himedia), e as placas foram incubadas a 37°C por 24 h. Colônias indicativas de *Enterococcus* sp. (cor negra) foram repicadas em meio ágar infusão cérebro e coração (BHI-Himedia), para a confirmação genotípica.

### 2.2 caracterização genotípica ao nível de gênero

Para a confirmação genotípica foram selecionados 10 colônias bacterianas. A extração de DNA total seguiu o método da fervura (Marques e Suzart, 2004), com modificações. Os isolados foram cultivados em 3 mL de caldo BHI, incubados sob agitação de 180 rpm, a 37°C por 18 horas. Após o crescimento, 1 mL de cada cultivo foi centrifugado por 10 min a 10000 rpm. O sedimento foi ressuspendido em 300  $\mu$ L de água ultrapura esterilizada. A suspensão de células foi aquecida a 100°C por 30 minutos e posteriormente, submetida a um choque térmico em banho de gelo por 5 minutos e novamente centrifugada. Um volume de 150  $\mu$ L do sobrenadante foi removido e armazenado em freezer a -20°C. A reações de PCR (Polimerase Chain Reation) foi realizada em termociclador (Techne-TC3000), em volume final de 20  $\mu$ L, contendo 10  $\mu$ L DNA (10ng/ $\mu$ L), 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M de cada dNTP, 20 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador *tuf* (específico para gênero de *Enterococcus*) (F TACTGACAAACCATTCATGAG; R AACTTCGTACCAACGCGAAC), 2,5U Taq DNA polimerase (Invitrogen).

O termociclador foi programado para realizar uma desnaturação de 94°C por 4 minutos, seguido por 30 ciclos de 95°C a 30 segundos, anelamento a 56°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 10 minutos. O controle negativo continha todos os reagentes, porém sem a amostra de DNA. Os produtos resultantes da amplificação foram separados em gel de agarose a 1,0%, corados com brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta e fotografados com sistema de fotodocumentação computadorizado (Loccus). O tamanho do produto amplificado esperado (112 pb) foi



comparado com o marcador de DNA ladder (Amersham Pharmacia Biotech).

### 2.3 Determinação da susceptibilidade das células planctônicas aos sanitizantes

Os isolados confirmados genotipicamente, foram submetidos ao teste de susceptibilidade aos sanitizantes químicos. Para tanto, sete formulações de diferentes compostos químicos foram utilizadas, segundo as recomendações de uso pelo fabricante (Tabela 1). A ação biocida foi avaliada em duas diferentes condições, sendo na presença de matéria orgânica, utilizando meio BHI, e na presença de água.

Princípio Ativo	Concentração Indicada pelo Fornecedor	Concentração Utilizada
Espumante alcalino clorado H	2,0%	20 µl/mL
Dióxido de Cloro	100 ppm	1 µl/mL
Hipoclorito de sódio	5 ppm	0,05 µl/mL
Amônia Quaternária M	1,5 %	15 µl/mL
Ácido Peracético	0,30 %	3 µl/mL

Tabela 1 – Descrição dos sanitizantes químicos utilizados na indústria de alimentos e concentração de uso

Fonte: Deion; Mundial Química; AEB Group; Higex; 2013.

Os isolados foram semeados em ágar Mueller-Hinton (MH) e incubados a 37°C por 18 horas. Uma porção da colônia foi selecionada e transferida para tubos contendo água estéril até turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/ml). Desta solução, 200 µL foi adicionado em poços de microtitulação seguido do acréscimo de 200 µL de água ou BHI, e a solução sanitizante. As placas foram incubadas a 37°C por 30 minutos. O desenvolvimento microbiano foi avaliado por densidade óptica ( $DO_{490 \text{ nm}}$ ), em leitor de Elisa.

Para calcular a concentração inibitória mínima, a leitura da DO foi normalizada. Para a normalização, a DO mensurada no tempo 0 de cada poço, foi denotado como DO background, e subtraído das leituras posteriores. Se houve diferença na DO acima do background, este foi considerado positivo para crescimento bacteriano.

A fim de verificar a viabilidade celular, uma alíquota de 10 µL foi retirada de cada poço e depositada na superfície de ágar KEA. As placas foram incubadas a 37°C por 18 a 24 h, e as colônias formadas foram contadas.

### 2.4 Ação de sanitizante em biofilme de *enterococcus*

A formação do biofilme em superfície de poliestireno foi realizada de acordo com metodologia descrita por Stepanovic et al. (2000). Os isolados de enterococos foram

cultivados a 37°C por 24 horas em meio BHI suplementado com 1% de glicose. A densidade celular foi ajustada até turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/ml), e uma alíquota de 200  $\mu$ L de cada suspensão foi transferida para placas de microtitulação de fundo chato. O controle negativo foi o inóculo de caldo sem a presença da bactéria. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, o meio e células planctônicas foram removidas das placas, e os poços lavados com água destilada estéril por três vezes.

Em seguida, foi adicionado o sanitizante nas concentrações indicadas pelos fabricantes. Após 30 minutos o sanitizante foi removido e os poços lavados com água destilada estéril por três vezes. A viabilidade celular foi observada utilizando o sal XTT [2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide], que produz uma coloração vermelho-alaranjado quando reduzido. O sal XTT foi preparado como solução saturada (1 mg/ml em PBS), esterilizado por filtração e estocado a -20°C. A solução utilizada foi diluída na concentração final de 0,5 mg/ml.

A mudança na coloração foi mensurada em  $DO_{490 \text{ nm}}$ . Presença de coloração vermelha-alaranjado indicou viabilidade celular (células vivas). Poços sem cultura bacteriana foram considerados controles negativo.

### 3 | RESULTADO E DISCUSSÃO

Foram realizados um total de 16 suabes na linha de produção de embutidos cárneos cozidos, sendo selecionado 10 colônias cor negra no ágar KEA, que indica a hidrólise da esculina na presença de bile por espécies de *Enterococcus* sp. As colônias selecionadas que apresentaram coloração negra no meio, característico de *Enterococcus* sp., foram submetidas à identificação molecular (Figura 1A). Como resultado obtivemos que 100% (10 isolados) possuíam o gene *tuf* que identifica o gênero *Enterococcus* sp., cujo tamanho do amplicon foi de 112 pares de base (pb) (Figura 1B).

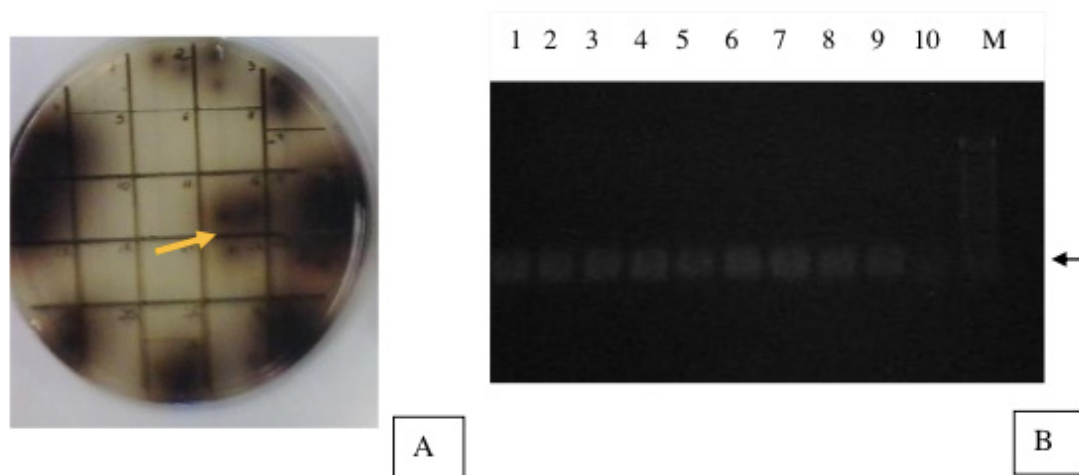


Figura 1 – (A) Colônias negras características do gênero *Enterococcus* em meio KEA

(canamicina esculina ágar); (B) Amplicon de 112 pb (seta preta) correspondente a parte do gene *tuf* que confirma o gênero *Enterococcus*. Numeros de 1 a 10 corresponde aos isolados selecionados. M corresponde ao marcador de peso molecular 1 KbdNA plus.

Neste estudo, observamos a ação de sanitizantes sobre células de *Enterococcus* sp. na presença de água e BHI, após 30 minutos de exposição. A eficiência biocida sobre as células foi realizada pela mensuração da DO, onde o valor da DO mensurada no tempo 0 (T0) foi subtraída da DO mensurada no tempo 30 minutos. DO acima da DO do tempo T0 foi considerado positivo para crescimento bacteriano (tabela 1).

Tempo	Espumante alcalino clorado H		Dióxido de Cloro		Hipoclorito de sódio		Amônia quaternária		Ácido peracético	
	Água	BHI	Água	BHI	Água	BHI	Água	BHI	Água	BHI
<b>30 minutos</b>	82%	29%	86%	100%	46%	100%	89%	86%	18%	100%

Tabela 1 – Porcentual de desenvolvimento celular dos isolados de enterococos em água e BHI contendo sanitizantes

Observa-se que nenhum produto utilizado conseguiu ser totalmente eficiente no controle do desenvolvimento dos enterococos em presença de água e de BHI. Os melhores resultados de ação do sanitizante sobre células de *Enterococcus* ocorreu com o espumante alcalino clorado H em meio BHI e ácido peracético em água. Em alguns casos observamos que o sanitizante não apresentou nenhuma eficiência contra *Enterococcus* sp, a exemplo do dióxido de cloro, hipoclorito de sódio e ácido peracético em meio BHI.

A fim de verificar a capacidade de sobrevivência celular na presença de sanitizantes, foi retirado uma alíquota da cultura e semeado em meio KEA. Observamos o desenvolvimento característico de colônias de *Enterococcus* sp, quando na presença dos produtos químicos, corroborando com os resultados obtidos pela DO, ou seja, os sanitizantes não eliminaram a quantidade de bactéria a níveis esperados, ou próximos aos níveis de segurança microbiológica.

Em nosso estudo, utilizamos o meio BHI para simular a presença de matéria orgânica, pois vários autores atribuem a aficiência dos sanitizantes à matéria-orgânica restante nas superfícies. Beltrame et al. (2012) afirma que o efeito dos sanitizantes pode ser alterado em função das características da superfície, temperatura e tempo de contato, concentração do produto, pH, propriedades físico-químicas da água e especialmente à presença de matéria orgânica. A perda da atividade na presença de matéria orgânica também é descrita nas pesquisas de Gelinás e Goulet (1983) e McDonnell e Russel (1999), variando com o princípio ativo e microrganismo alvo, demonstrando a importância de validações para escolha de produtos a serem utilizados em programas de higiene.

Ayhan et al. (1999), testaram duas concentrações de hipoclorito de sódio (0,5% e 5,25%), sobre microrganismos comumente encontrados em sistemas de canais radiculares, entre eles *E. faecalis*, e verificaram que a maior concentração resultou em diminuição significativa no crescimento da bactéria. Negreiros et al. (2014) identificou isolados de *E. faecalis* tolerantes as concentrações de 2,5% e 8,5% de hipoclorito de sódio (sem presença de matéria-orgânica). Nesta pesquisa observou-se que o hipoclorito em presença de água conseguiu diminuir o crescimento microbiano porém em solução com BHI foi totalmente ineficiente, assim como o dióxido de cloro.

Fraise (2002) explica que os possíveis mecanismos de tolerância a biocidas em cocos gram-positivos incluem bombas de efluxo, alteração do sítio alvo e mudanças na estrutura da parede celular. Para Cânoa (2008) uma das desvantagens da utilização do cloro é que este biocida é rapidamente inativado pela matéria orgânica, tendo escassa atividade quando aplicado a superfícies de carcaças e de equipamentos sujos por resíduos durante o processo. Segundo Sander et al. (2002), bactérias apresentam tolerância após uma exposição prolongada aos desinfetantes, e bactérias do mesmo gênero e espécie podem apresentar diferenças na sensibilidade frente ao mesmo desinfetante.

Quando aplicamos os sanitizantes sobre biofilme de *Enterococcus*, também obtivemos que nenhum dos agentes químicos foram eficientes na morte e remoção do biofilme (Figura 2). Para esta avaliação, foi mensurada a capacidade da célula em reduzir o composto XTT, mostrando assim a viabilidade celular (Figura 3). Embora os isolados sejam todos do gênero *Enterococcus*, cada isolado apresentou comportamento distintos em relação à resistência aos sanitizantes químicos, demonstrando assim um resultado preocupante, já que o comportamento dos microrganismos são metabolicamente distintos.

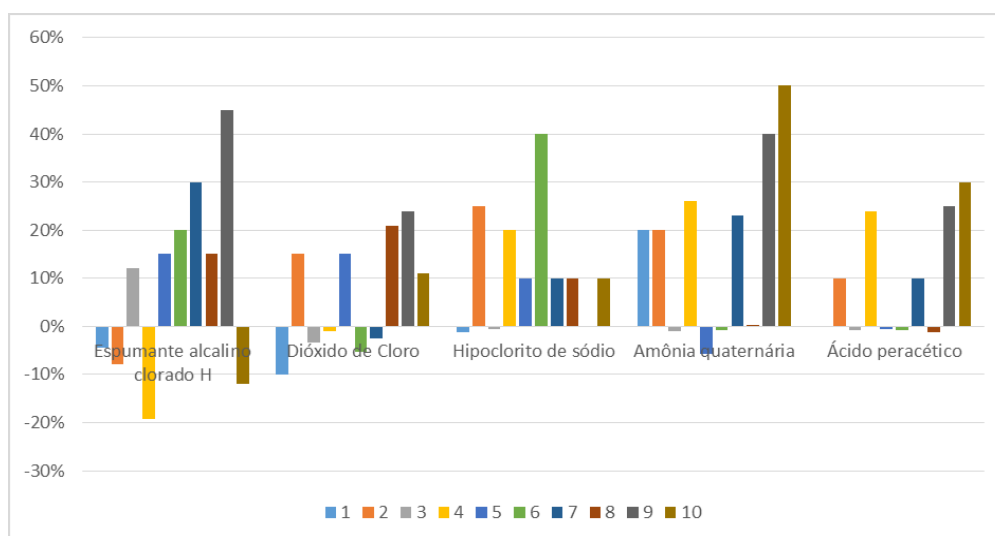


Figura 2 – Resultados do percentual de células viáveis no biofilme após ação dos sanitizantes; dados mensurados com o composto XTT. Os números 1 a 10 indica os isolados de *Enterococcus* utilizados neste estudo.

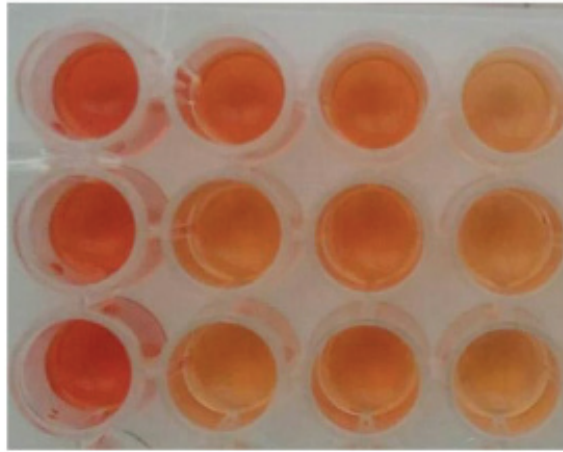


Figura 3 – Ensaio de redução do Sal XTT nos biofilmes formados por *Enterococcus* sp após contato com sanitizantes químicos. A cor laranja-avermelhada indica redução do sal pela cadeia respiratória bacteriana, indicando viabilidade celular.

Ziech (2015) ao avaliar a tolerância do biofilme maduro formado no polipropileno (PP) e poliuretano (PU) à sanitizantes comumente utilizados na indústria (detergente alcalino clorado, ácido peracético e ambos combinados), obteve os melhores resultados de inativação de *Salmonella* sp. Contudo, nossos resultados mostram que por se tratar de bactéria Gram positiva talvez a resistência do biofilme seja maior.

Jessen e Lammert (2003) afirmam que a remoção de micro-organismos de superfícies de contato torna-se muito mais difícil após a formação do biofilme, e geralmente este procedimento só será possível pela adoção de várias ações combinadas, como a utilização de mais de um sanitizante.

Hood e Zottola (1997) afirmam que comparar resultados de estudos de eficiência de sanitizantes é complexo devido à variação nas condições para a aderência e desenvolvimento do biofilme, podendo interferir na ação do agente sanitizante. Variáveis como as características microtopográficas das superfícies, rugosidade, presença de fissuras ou fendas podem diminuir a eficiência do processo de higienização e interferir diretamente nos resultados obtidos (ANDRADE; PINTO; LIMA, 2008). Estes resultados indicam a necessidade de vastas avaliações e validações pelas indústrias a fim de estabelecer o melhor sanitizante e/ou a combinação deles e as concentrações para possibilitar a eliminação/redução dos biofilmes.

Embora o ácido peracético seja considerado um dos mais efetivos no combate a biofilmes bacterianos e sua alta eficiência tem sido atribuída a grande capacidade de oxidação do material celular (ROSSONI; GAYLARDE, 2000), esses dados não corroboraram com nossos resultados, uma vez que 50% de nossos isolados não foram eliminados com esse agente químicos.

Moura et al. (2011) atestaram que o uso de quaternária amônia a 0,26% acrescido de leite em pó reconstituído foi eficiente no controle de *Enterococcus* após 15 minutos de contato. Entretanto, Sander et al. (2002) ao confrontar 17 amostras de *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia*

e *Pasteurella*, provenientes de avicultura, verificaram que a amônia quaternária foi incapaz de promover inativação das amostras. Neste estudo, também observamos quaternária amônia não apresentou eficiência no controle de *Enterococcus*.

A ação dos sanitizantes é afetada pelo tipo e concentração de microrganismos contaminantes, características da superfície, tempo e temperatura de 25 contato, concentração de uso, tipos de resíduos presentes na superfície, pH, propriedades físico-químicas da água e, por substâncias inativadoras (ANDRADE et al., 2008).

Ainda são escassos os trabalhos abordando a temática da resistência bacteriana a sanitizantes de uso industrial. Nosso estudo foi pioneiro na análise da sensibilidade de *Enterococcus* sp, provenientes da linha de produção de embutidos, frente a 5 sanitizantes de uso industrial.

## 4 | CONCLUSÃO

Os procedimentos de higienização e sanitização nas indústrias contemplam diversas etapas, dentre elas, recolha dos maiores resíduos, remoção de matéria orgânica e/ou resíduo com auxílio de água quente, dispersão de espuma através de equipamentos e ação física, enxague (com água quente) e sanitização. Estas etapas visam aumentar a eficiência dos processos e ação dos produtos químicos. Os resultados desta pesquisa devem ser utilizados como alerta para ressaltar a importância de ações preventivas nas indústrias, como validações dos processos de higienização, rotatividade entre os produtos químicos para evitar a resistência dos microrganismos a determinados compostos e avaliação do local (composição dos resíduos, tempo disponível para higienização e sanitização, composição dos equipamentos e/ou estruturas) para maximizar a eficiência dos procedimentos aplicados.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, N. J.; PINTO, C. L. O.; LIMA, J. C. Adesão e formação de biofilmes microbianos. In: ANDRADE, N. J. **Higiene na Indústria de Alimentos – Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. 2 ed. São Paulo (SP): Varela, 2008, 410 p.

ARIAS, C. A., MURRAY, B. E. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, p. 266-278, 2012.

AYHAN, H.; SULTAN, N.; CIRAK, M.; RUHI, M. Z.; BODUR, H. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. **International Endodontic Journal**, v. 32, p. 99-102, 1999.

BELTRAME, C. A.; KUBIAK, G. B.; LERIN, L. A.; ROTTAVA, I.; MOSSI, A. J.; OLIVEIRA, R.; CANSIAN, R. L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G. Influence of different sanitizers on food contaminant bacteria: effect of exposure temperature, contact time, and product concentration. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 32, n. 2, p. 228-233, abr.-jun. 2012.

BERESFORD, M. R.; ANDREW, P. W.; SHAMA, G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 1000-1005, 2001.



BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº326, de 30 de julho de 1997. Regulamentos Técnicos sobre Inspeção Sanitária, boas Práticas de Produção/Prestação de Serviços e Padrão de Identidade e qualidade na Área de alimentos. **Diário Oficial da União República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 01 ago. 1997.

CÂNOA, Jorge Miguel Horta. **Requisitos para a implantação do HACCP em matadouros de aves**. 2008. 98 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2008.

CASTRO, Marcília Santos Rosado. **Enterococcus spp. e Pseudomonas spp. isolados de ambiente de processamento de produtos lácteos: identificação, formação de biofilmes multi-espécies e controle por agentes sanitizantes**. 2012. 225 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2012.

CHEN, J.; ROSSMAN, M. L.; PAWAR, D. M. Attachment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to the surface of beef and a culture medium. **Food Science and Technology**, Oxford, v. 40, p. 249-254, 2007.

CLONTZ, Lucia. A contaminação microbiana pode causar uma redução de fluxo e corrosão das linhas do sistema de água. **Revista Controle de Contaminação**, n. 109, 2008.

DONK, D. P. V.; GAALMAN, G. Food safety and hygiene systematic layout planning of food processes. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 82 (A11), p. 1485–1493, Novembro/2004.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

EUZÉBY, J. P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. 2015. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/-allnames.html>>. Acesso em: 15 out. 2015.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v. 155, p. 1749-1757, 2009.

FOUQUIÉ-MORENO, M. R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 1-24, 2006.

FRAISE, A. P. Susceptibility of antibiotic-resistant cocci to biocides. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v. 31, p. 158S-162S, 2002.

FRANZ, C. M. A. P.; STILES, M. E.; SCHLEIFER, K. H.; HOLZAPFEL, W. H., Enterococci in foods – a conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 105-122, 2003.

FUSTER-VALLS, N.; HERNÁNDEZ-HERRERO, M.; MARÍN-DE-MATEO, M.; RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J. Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. **Food Control**, v. 19, n. 3, p. 308-314, 2008.

GELINAS, P.; GOULET, J. Neutralization of the activity of eight disinfectants by organic matter. **Journal of Applied Microbiology**, v. 54, p. 243-247, 1983.

GELSOMINO, R.; VANCANNEYT, M.; CONDON, S.; SWINGS, L.; COGAN, T. M. Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 177-188, 2001.

GIRAFFA, Giorgio. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 215-222, 2003.

- GRAM, L.; BAGGE-RAVN, D.; NG, Y. Y.; GYMOESE, P.; VOGEL, B. F. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, p. 1165-1171, 2007.
- HERRERA, J. J. R.; CABO, M. L.; GONZÁLEZ, A.; PAZOS, I.; PASTORIZA, L. Adhesion and detachment kinetics of several strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three different experimental conditions. **Food Microbiology**, v. 24, n. 6, p. 585-591, 2007.
- HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. A. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, p. 145-153, 1997.
- IVERSEN, A.; KÜHN, I.; FRANKLIN, A.; MÖLBY, R. High prevalence of vancomycin resistant enterococci in Swedish sewage. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2838–2842, 2002.
- JESSEN, B.; LAMMERT, L. Biofilm and Disinfection in Meat Processing Plants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 265-269, 2003.
- JOHNSTON, L. M.; JAYKUS, L. A.; MOLL, D.; ANCISO, J.; MORA, B.; MOE, C. L. A Field study of the microbiological quality of fresh produce of domestic and Mexican origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, p. 83-95, 2006.
- MANSFELD, Florian. The interaction of bacteria and metal surfaces. **Electrochimica Acta**, v. 52, n. 27, p. 7670-7680, 2007.
- MARQUES, E. B.; SUZART, S. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina Brazil. **Journal Medical Microbiology**, v. 53, p. 1069–1073, 2004.
- McDONNELL, G.; RUSSEL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 147–179, 1999.
- MOURA, A. C. de; SANTOS, A. M. dos; PINTO, F. G. da S.; PEREIRA, K. K. Perfil de resistência microbiana aos principais sanitizantes utilizados em frigoríficos da cidade de Cascavel no Paraná. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo-SP, v. 25, n. 202/203, p. 170-175, nov./dez. 2011.
- NEGREIROS, M. O.; FRAZZON, J.; FRAZZON, A. P. G. Estudo in vitro da ação de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio sobre *Enterococcus faecalis*. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 8, n. 2, p. 41-50, 2014.
- PEREIRA, M. A.; ALVES, A. A.; AZEREDO, J.; MOTA, M.; OLIVEIRA, R. Influence of physico-chemical properties of porous microcarriers on the adhesion of an anaerobic consortium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 181-186, 2000.
- ROSSONI, E. M. M.; GAYLARDE, C. C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p. 81-85, 2000.
- RUSSELL, John B. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 73, p. 363-370, 1992.
- SANDER, J. E.; HOFACRE, C. L.; CHENG, I-H.; WYATT, R. D. Investigation of resistance of bacteria from commercial poultry sources to commercial disinfectants. **Avian Disiases**, Washington, v. 46, p. 997-100, 2002.
- STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, Karlsruhe, v. 36, n. 1, p. 1-29, Abr/1997.

USEPA, UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2009 Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisores. Washington D. C: USEPA, **Office of Water**, 2009 (EPA 822-R-09-011).

VIANA, Eliseth de Souza. **Moléculas sinalizadoras de *Quorum Sensing* em biofilmes formados por bactérias psicrotólicas isoladas de leite**. 2006. 176 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Departamento de Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2006.

## SIMULAÇÃO NUMÉRICA DA PROPAGAÇÃO DE ONDAS CISALHANTES EM ROCHAS SEDIMENTARES A PARTIR DE IMAGENS MICROTOMOGRÁFICAS DE RAIOS X

### **Túlio Medeiros**

Universidade Federal de Campina Grande  
Campina Grande – Paraíba

### **José Agnelo Soares**

Universidade Federal de Campina Grande  
Campina Grande – Paraíba

### **Ronildo Otávio de Oliveira Neto**

Universidade Federal de Campina Grande  
Campina Grande – Paraíba

### **Juliana Targino Batista**

Universidade Federal de Campina Grande  
Campina Grande – Paraíba

**RESUMO:** O presente trabalho teve por objetivo determinar através de simulações as velocidades de ondas cisalhantes em amostras de arenitos e rochas carbonáticas. Para tanto, foi necessário a utilização do programa *Avizo Fire*® 8.1, responsável pela fase inicial, e do *Comsol Multiphysics*® 4.2, onde ocorreram as simulações. A princípio foram geradas as malhas das quatro amostras, sendo dois arenitos e dois carbonatos. Na sequência, os arquivos contendo as malhas geradas no *software Avizo Fire*® 8.1 foram importados pelo *Comsol Multiphysics*® 4.2. A partir desse momento, foram simuladas explosões na face de baixo de cada malha e medidas as velocidades de ondas cisalhantes referentes a cada amostra. Como

resultado da petrofísica computacional, tem-se os valores dos limiares entre os tons de cinza referentes aos espaços porosos e os referentes a matriz mineral de cada amostra. Além disso, determinou-se uma velocidade de 2322 m/s, 2116m/s, 2897m/s e 2181m/s para as amostras A7, A9, TFG e TCR, respectivamente. Para fins de comparação, foram utilizados os valores das velocidades para as mesmas amostras obtidos pela petrofísica convencional. Por fim, devido à proximidade dos valores obtidos nas simulações computacionais com os resultados da petrofísica convencional, infere-se que o método desenvolvido nesse trabalho é preciso e confiável, porém é complexo e exige um grande processamento de dados devido ao tamanho da malha gerada.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ondas Cisalhantes, Petrofísica computacional, Propriedades petrofísicas.

**ABSTRACT:** The aim of the present work is to determine the shear wave velocities in samples of sandstones and carbonate rocks through simulations. For this purpose, it was necessary to use the programs *Avizo Fire*® 8.1, responsible for the initial phase, and *Comsol Multiphysics*® 4.2, in which the simulations were performed. At first, the meshes of four samples (two sandstones and two carbonates) were generated. Subsequently, the files containing the

meshes generated in Avizo Fire® 8.1 software were imported by Comsol Multiphysics® 4.2. From that moment, explosions were simulated on the underside of each mesh and the wave velocities for each sample were measured. As a result of computational petrophysics, there are the values of the thresholds between the gray tones, referring to the porous spaces, and those referring to the mineral matrix of each sample. In addition, a velocity of 2322 m/s, 2116m/s, 2897m/s and 2181m/s were determined for the samples A7, A9, TFG and TCR, respectively. For the purpose of comparison, the velocities of the same samples obtained by means of conventional petrophysics were used. Finally, due to the proximity of the values obtained in the computational simulations with the results of the conventional petrophysics, it is inferred that the method developed in this work is accurate and reliable, but it is complex and requires a large data processing due to the size of the mesh generated.

**KEYWORDS:** Shear waves, Computational petrophysics, Petrophysical properties.

## 1 | INTRODUÇÃO

As propriedades elásticas das rochas são essenciais para prever o comportamento das ondas P (compressionais ou primárias) e S (cisalhantes ou secundárias) durante seus deslocamentos na subsuperfície da Terra. Inclusive esse é o princípio da sísmica, principal método de investigação e dimensionamento de campos de petróleo. O método sísmico é responsável por mais de 90% dos investimentos em prospecção (THOMAS, 2001).

As ondas se propagam a partir de uma fonte e são definidas por Kearey *et al.* (2009) como “pacotes de energia de deformação elástica que se propagam radialmente”. Elas se diferenciam entre si devido a alguns fatores como a direção de polarização, a velocidade e o meio de propagação. As ondas secundárias, por exemplo, ao contrário das ondas primárias, não se propagam em fluidos pouco viscosos.

Observa-se, nos últimos anos, a busca pelo conhecimento das propriedades físicas das rochas, destacando-se nessa área a ascensão da petrofísica computacional, que obtém resultados cada vez mais precisos. O estudo das propriedades petrofísicas tem o intuito de aumentar o grau de confiabilidade ao realizar operações de cunho exploratório ou exploratório em um campo de petróleo.

Nos ensaios laboratoriais (petrofísica convencional) utilizam-se plugues, amostras cilíndricas de rochas, e os submetem a condições de temperatura, saturação de fluido e pressão similares as condições *in situ* do reservatório. Em contrapartida, o método computacional utiliza imagens de subamostras extraídas de plugues, também conhecidas como *slices*, que são obtidas por meio do imageamento por tomografia de raios x de alta resolução.

As simulações computacionais são ferramentas que possibilitam simular uma amostra sob as mais diversas condições termodinâmicas. Além disso, é importante destacar a rapidez dos ensaios e a precisão dos resultados. Conforme Apolinário

(2016), os ensaios computacionais são realizados de forma rápida e contemplam um grande número de amostras.

De acordo com Sousa (2017), a simulação da propagação de ondas S apresenta resultados satisfatórios quando realizada em amostras de arenitos e carbonatos. Vários autores (KNACKSTEDT *et al.*, 2009; DVORKIN *et al.*, 2011; MEDEIROS, 2013), têm destacado a velocidade e a qualidade dos resultados encontrados nas simulações, no entanto, há poucos trabalhos que abordam os comportamentos das ondas secundárias.

Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivo determinar as velocidades das ondas cisalhantes, assim como analisar seus comportamentos ao se propagarem em arenitos e rochas carbonáticas, através da petrofísica computacional com o auxílio dos *softwares Avizo Fire*® 8.1 e *Comsol Multiphysics*® 4.2.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi dividido em quatro etapas, que abrange desde a obtenção das imagens microtomográficas até as simulações no software *Comsol Multiphysics*® 4.2. A ordem das tarefas está exemplificada na Figura 1.



Figura 1. Fluxograma das atividades realizadas

### 2.1 Obtenção dos slices

Para a realização das simulações foram utilizadas quatro conjuntos de imagens, referentes a dois arenitos (um arenito grosso, A7, e um fino, A9) e a duas tufas carbonáticas (tufa Cachoeira Roncados, TCR, e tufa Felipe Guerra, TFG). Os arenitos são oriundos da Bacia do Rio do Peixe, já as tufas são da Bacia Potiguar. As imagens foram obtidas das amostras por meio da microtomografia de raio x, que de acordo com Holleben (1993), é uma técnica não destrutiva e permite a visualização das estruturas internas das rochas.



A aquisição das imagens microtomográficas, denominadas slices, foi realizada no Laboratório de Meios Porosos e de Propriedades Termofísicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Nesse processo, os slices foram resultados do registro e do processamento dos dados, que, por sua vez, são obtidos na forma de projeções da amostra sobre o detector plano. Cada subamostra é composta por mais de 1500 slices e cada um deles ocupa um espaço na memória de, aproximadamente, 2 milhões de bytes. Os slices quando empilhados formam um corpo 3D, Figura 2.

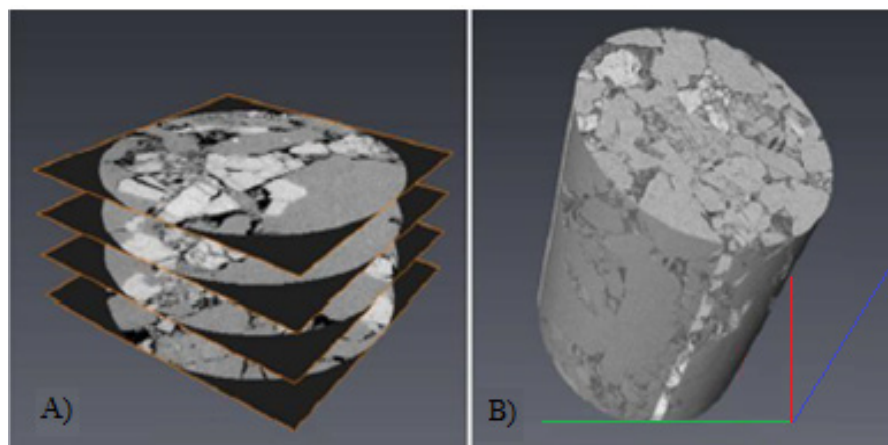


Figura 2. A) Slices empilhados; B) Estrutura 3D de uma amostra. Adaptada de Porto (2015)

## 2.2 Geração da Malha 3D

Na sequência as imagens microtomográficas foram importadas para o *software Avizo Fire*® 8.1, cuja finalidade é gerar as malhas necessárias a simulação da propagação de ondas no *software Comsol Multiphysics*® 4.2. Essa etapa vai desde a visualização dos *slices* pelo comando *ortho slice*, Figura 3, até a criação de uma complexa estrutura tridimensional composta por poros e a matriz.

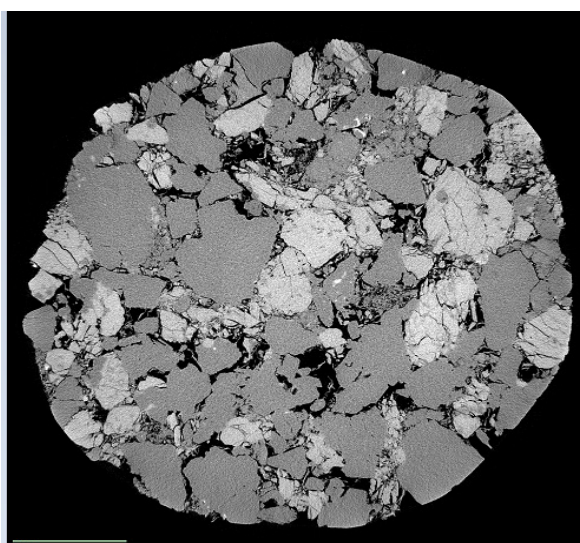


Figura 3. Slice da amostra A7

Foi crucial a determinação do parâmetro que representa a separação, o limiar, entre os tons de cinza referentes aos espaços porosos (mais escuros) e os tons

de cinza referentes a matriz mineral (mais claros). Esse limiar é obtido por meio da ferramenta *Multi-Thresholding*, mas antes é necessário a utilização do comando *Extract Subvolume*, que possibilita a escolha de um volume representativo da amostra. Uma escolha correta de um *subvolume* reduz o tamanho da imagem a ser processada e evita o chamado efeito de borda, que compromete a qualidade dos resultados gerados. A Figura 4 mostra a sequência de comandos que foram utilizados para a descoberta do limiar de cinza.

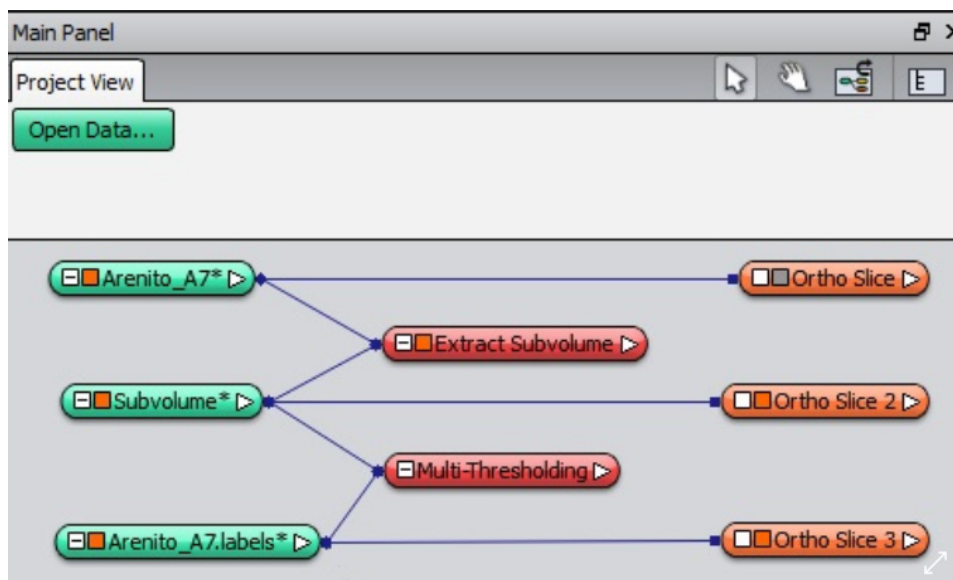


Figura 4. Comandos para determinar o limiar

Na sequência foi realizada a atividade de geração de malhas, processo que demonstrou ser complexo e demorado, exigindo uma boa capacidade de processamento do computador. Foram utilizados uma série de comandos nessa etapa, os quais são mostrados na Figura 5. Inicialmente, os *slices* foram visualizados pelo comando *Ortho Slice* e houve a escolha do *subvolume* mais representativo por meio do *Extract Subvolume*. Depois utilizou-se a ferramenta *Edit New Label Field*, onde ocorreu a binarização da futura malha.

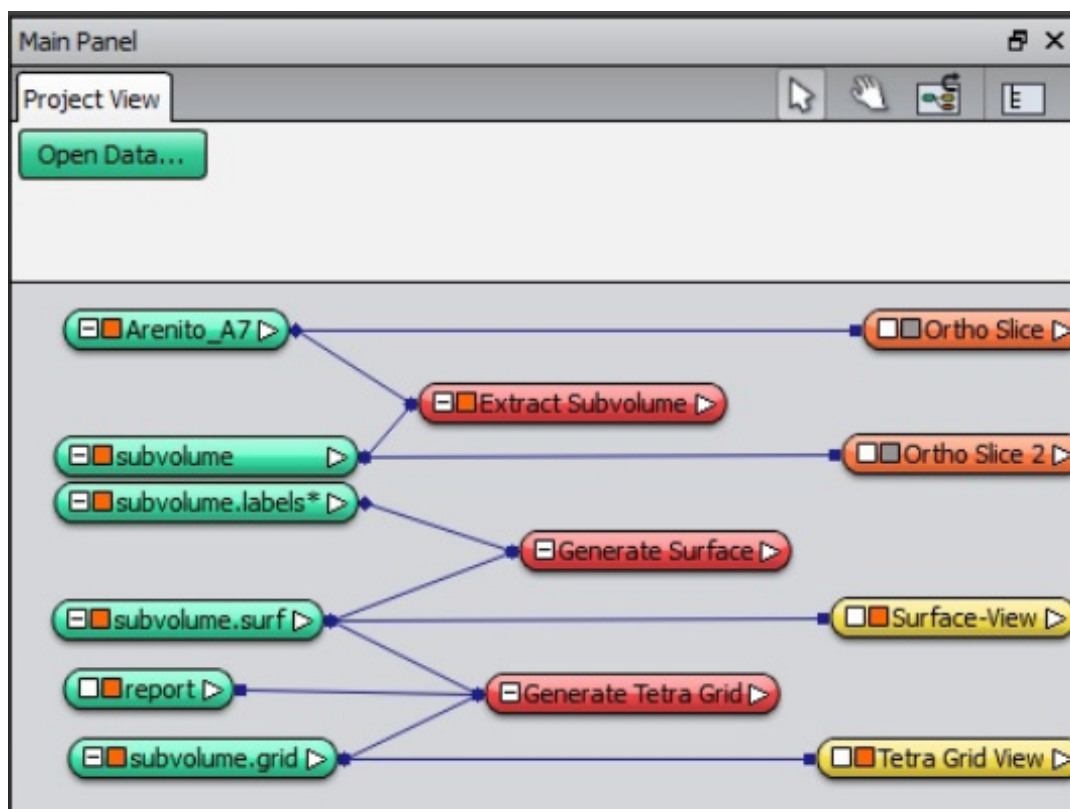


Figura 5. Conjunto de comandos necessários a geração da malha A7

Nessa ferramenta há a separação entre os espaços porosos e a matriz mineral nas imagens microtomográficas por meio do valor do limiar encontrado com o comando *Multi-Thresholding*. Na Figura 6 é possível identificar a segmentação proporcionada pelo *Edit New Label Field*. Os poros estão tracejados com a cor amarela.

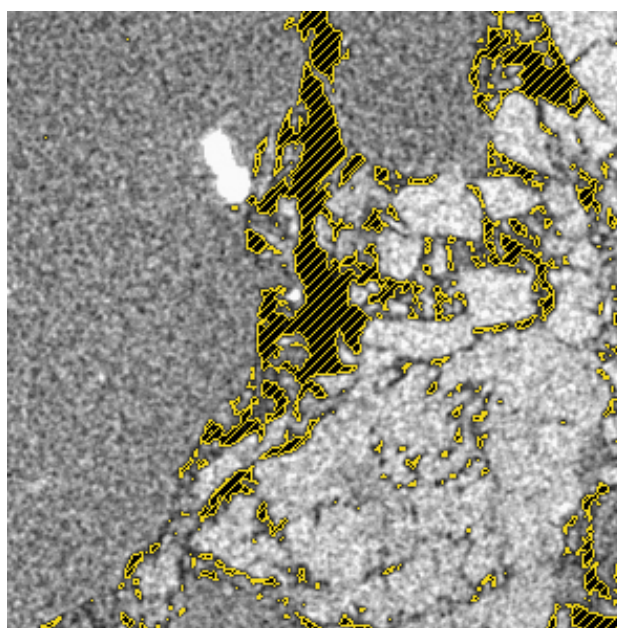


Figura 6. Segmentação da amostra TCR

Utilizou-se o comando *Generate Surface* para construir a estrutura tridimensional.

Além dessa função, o *Generate Surface* corrige, por meio da ferramenta *Simplification Editor*, as intersecções das faces dos elementos tetraédricos, as orientações dessas faces, assim como as razões de aspecto e a qualidade dos tetraédros. A Figura 7 mostra o resultado do *Generate Surface*. Nela é possível identificar a rede de poros da amostra A9, representada pelos triângulos amarelos. A parte sem cor é a matriz mineral.

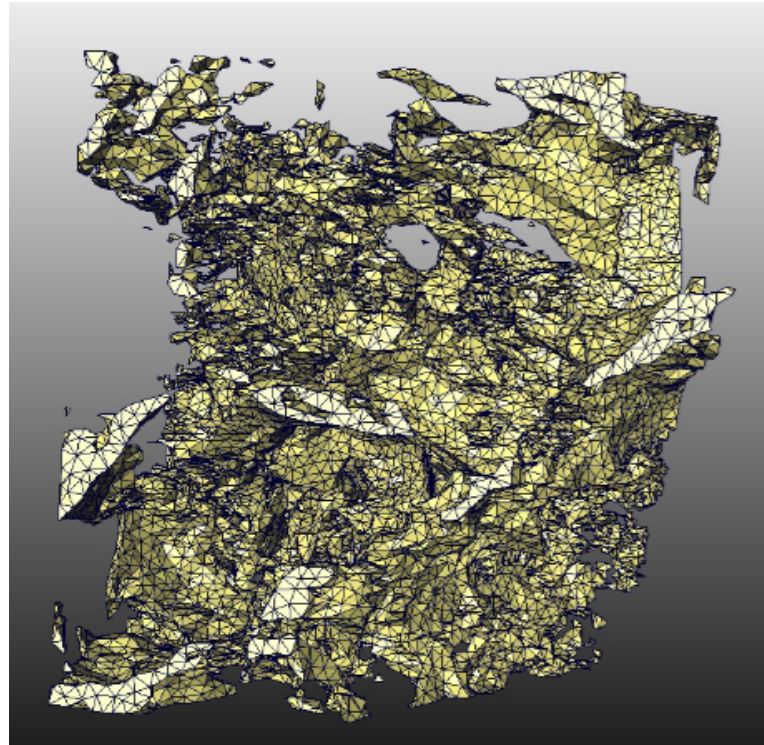


Figura 7. Rede de poros da amostra A9

Por fim, o último passo realizado no *Avizo Fire*® 8.1 foi gerar a malha, através do *Generate Tetra Grid*, e criar um arquivo no formato *bdf* compatível com o software *Comsol Multiphysics*® 4.2. A malha referente a tufa TFG é mostrada na Figura 8 e representa a primeira etapa da simulação.



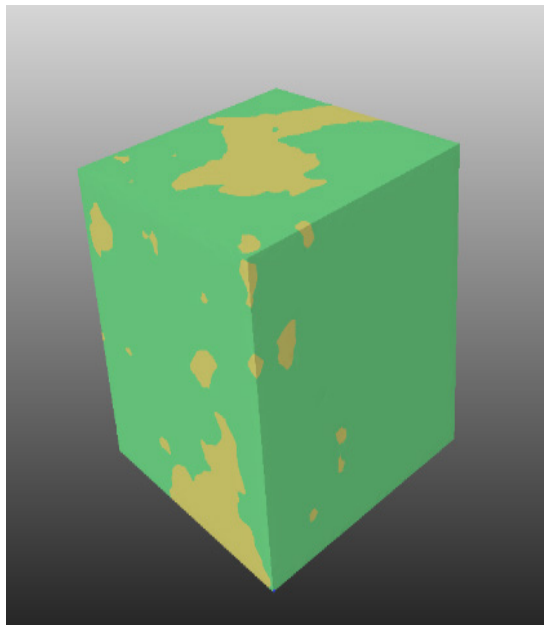


Figura 8. Malha da amostra TFG

### 2.3 Simulação da propagação de ondas S

A malha foi importada para o software *Comsol Multiphysics*® 4.2, onde foram identificados os materiais que compõem cada fase da amostra e escolhidos os fluidos que preenchem os espaços porosos. Utilizou-se o calcário bandado como componente da matriz para as duas tufas carbonáticas e o quartizito para os dois arenitos. Com relação ao fluido presente nos espaços porosos, optou-se pelo ar, mas havia outras opções, como a água e o óleo.

Foram fornecidas ao programa algumas propriedades essenciais a simulação, de acordo com Mavko *et al.* (2009), tais como: densidade e velocidade de propagação do som em cada fase da amostra; o valor da compressibilidade para o ar; e os módulos de cisalhamento e incompressibilidade para os calcários e arenitos. Os valores são mostrados na Tabela 1. Por fim, simulou-se uma explosão de curta duração na face de baixo da malha.

Propriedade	Calcário bandado	Ar
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	2,71	1,3E-3
Compressibilidade (1/Pa)	-	1,01E-5
Módulo de cisalhamento (GPa)	33	-
Módulo de incompressibilidade (GPa)	76,8	-
Velocidade do som (m/s)	6000	340

Tabela 1. Dados de entrada para o *Comsol Multiphysics*® 4.2.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

No *software Avizo Fire*® 8.1 foram identificados, através da ferramenta *Multi-*

*Thresholding*, os limiares entre a região porosa e a matriz mineral das quatro amostras. Os resultados são mostrados na Tabela 2.

Amostra	Limiar
A7	64
A9	74
TFG	28
TCR	56

Tabela 2. Limiares referentes as quatro amostras

Os arenitos apresentaram os maiores limiares, portanto o programa considerou como regiões porosas uma faixa de tons de preto à cinza maior para as amostras A7 e A9 do que para as tufas TFG e TCR.

No *software Comsol Multiphysics*® 4.2 foram simuladas as propagações das ondas S, e obteve-se como resultados os histogramas, que fornecem as velocidades das ondas, e os corpos tridimensionais com os respectivos comportamentos das ondas cisalhantes ao se propagarem pelas amostras. Na Figura 9 é mostrado o comportamento da onda S ao percorrer o arenito A7.

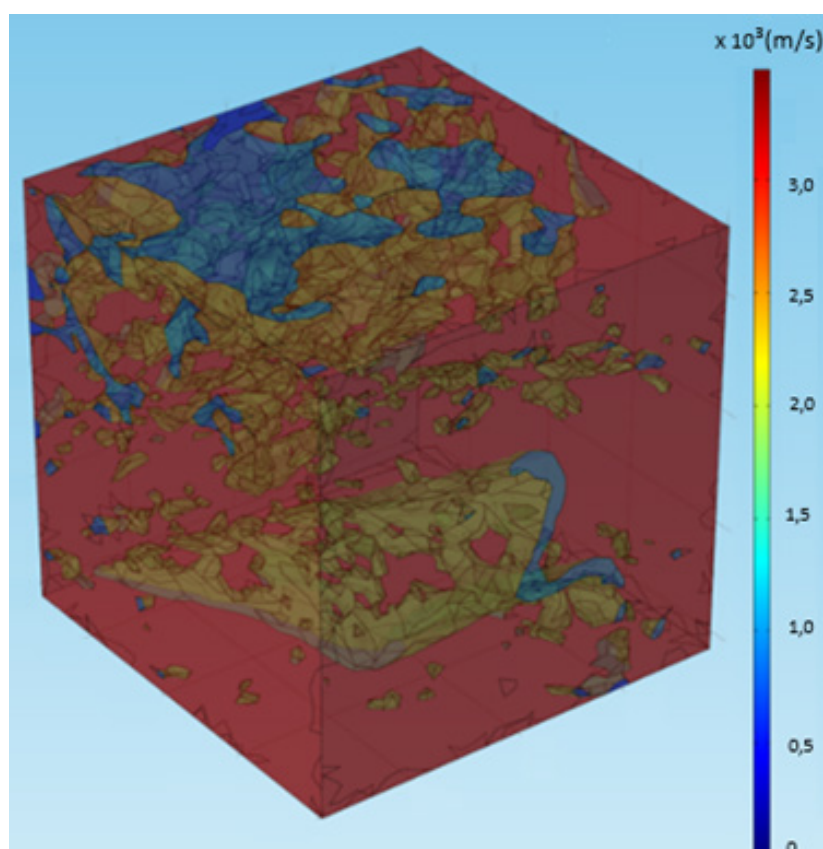


Figura 9. Propagação da onda cisalhante na amostra A7

Por meio dessa imagem, é possível identificar as diferentes velocidades da onda ao percorrer o arenito. Além disso, observa-se a estrutura de poros da amostra, pois os



espaços porosos são representados pelas cores azuis e amarelas, ou seja, as regiões com menores velocidades de propagação. Já a matriz mineral está representada pela cor vermelha e apresenta as velocidades mais altas. Conforme Oliveira (2005), as altas e baixas velocidades são justificadas pela maior ou menor resistência do material ao cisalhamento.

A partir dos histogramas gerados são realizados os cálculos das velocidades, dados pela multiplicação do valor médio de cada barra vertical pela sua respectiva porcentagem. A Figura 10 mostra o histograma referente ao arenito A7.

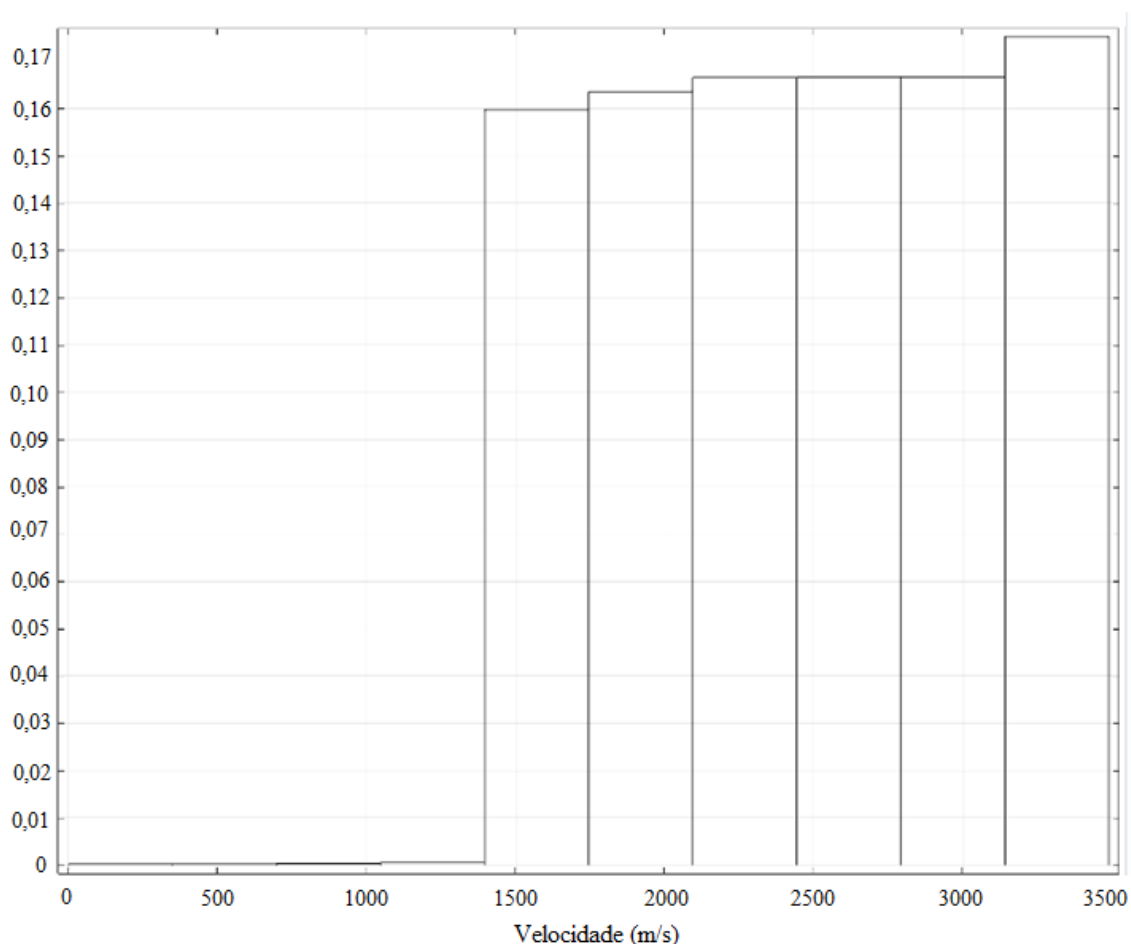


Figura 10. Representação da velocidade de propagação da onda cisalhante ao percorrer a amostra A7

Para fins de comparação foram utilizadas as velocidades obtidas convencionalmente por Sousa (2017). Esses valores juntamente com os obtidos nas simulações desenvolvidas no presente trabalho são mostrados na Tabela 3. Os desvios foram calculados em relação aos valores dos ensaios convencionais.

Amostra	Velocidades das simulações (m/s)	Velocidades obtidas convencionalmente (m/s)	Desvio (%)
A7	2322	2341	0,81
A9	2116	2035	3,98

TFG	2897	2984	2,92
TCR	2181	2362	7,66

Tabela 3. Comparação dos resultados das simulações com os obtidos convencionalmente.

Devido aos baixos valores dos desvios, é possível identificar a proximidade entre os resultados de ambas petrofísicas. Por consequência, nota-se que as simulações utilizando o *software Comsol Multiphysics*® 4.2 foram precisas.

## 4 | CONCLUSÕES

A simulação da propagação de ondas cisalhantes em rochas carbonáticas e arenitos, utilizando o *software Comsol Multiphysics*® 4.2, é um método inovador - há poucos trabalhos com essa especificidade. Ademais, a possibilidade de submeter às amostras a inúmeras condições termodinâmicas, enfatizam a importância dessa técnica. Outro ponto a ser considerado, é que as simulações não alteram as condições iniciais das amostras. Portanto, não sofrem influência devido a mudanças na estrutura do corpo ensaiado, ao contrário dos experimentos convencionais.

Com relação a etapa responsável pelas gerações das malhas, através do *software Avizo Fire*® 8.1, ela exigiu um grande processamento de dados e demonstrou um alto grau de complexidade.

Por fim, devido as proximidades dos valores obtidos nas simulações computacionais com os resultados da petrofísica convencional, o método desenvolvido no presente trabalho é preciso e confiável. Desse modo, representa um avanço para a petrofísica computacional e possibilita um maior conhecimento acerca comportamento das ondas S.

## REFERÊNCIAS

- APOLINÁRIO, F. O. **Influência da saturação fluida nas propriedades elásticas de rochas carbonáticas**. 2016. 156f. Dissertação (Mestrado em Exploração Petrolífera) – Programa de Pós-Graduação em Petrolífera e Mineral, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2016.
- DVORKIN, J.; DERZHI, N.; DIAZ, E.; FANG, Q. Relevance of computational rock physics. **Geophysics**. Tulsa, vol. 76, nº 5, p 1-5, 2011.
- HOLLEBEN, C. R. C. **Determinação de porosidade e saturações de fluidos através da tomografia computadorizada de raios-x**. 1993. 198f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Petróleo) – Centro de Estudos de Petróleo, Universidade Federal de Campinas, São Paulo, 1993.
- KEAREY, P.; BROOKS, M.; HILL, I. **Geofísica de Exploração**. São Paulo: Oficina de Textos, 2009. 438p.
- KNACKSTEDT, M. A.; LATHAM, S.; MADADI, M.; SHEPPARD, A.; VARSLOT, T.; ARNS, C. Digital rock physics: 3D imaging of core material and correlations to acoustic flow properties.

**Geophysics.** Tulsa, v.28, n.1, p. 1-5, 2009.

MAVKO, G.; MUKERJ, T.; DVORKING, J. **The rock physics Handbook: tools for seismic analysis in porous media.** New York: Cambridge University Press, 2009. 522p.

MEDEIROS, L. C. **Petrofísica computacional aplicada.** 2013. 18f.; Trabalho de conclusão de curso submetida ao curso de Engenharia de Petróleo, Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2013.

OLIVEIRA, J. K. **Efeitos da porosidade efetiva e da argilosidade nas velocidades de ondas P no Arenito Namorado.** 2005. 61f. Monografia submetida ao curso de graduação em Geologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

PORTO, A. L. (2015). **Estimação de propriedades petrofísicas de rochas sedimentares a partir de imagens microtomográficas de raios X.** 2015. 140f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos). – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2015.

SOUSA, W. B. **Simulação numérica de propagação da onda cisalhante em rochas sedimentares a partir de imagens microtomográficas de raios x.** 2017. 66f. Dissertação (Mestre em Exploração Petrolífera) – Programa de Pós-Graduação em Petrolífera e Mineral, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2017.

THOMAS, J. E. **Fundamentos de Engenharia de Petróleo.** Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2001. 278p

## STABILITY OF PECTINASE OF *ASPERGILLUS NIGER* IOC 4003 IN DIFFERENT SALTS FOR PURIFICATION IN BIPHASIC AQUEOUS SYSTEM

**Millena Cristiane de Medeiros Bezerra  
Jácome**

Federal University of Rio Grande do Norte, Natal / RN, Brazil; PPGEQ - Graduate Program in Chemical Engineering; Laboratory of Biochemical Engineering)

E-mail: millena.cristiane@gmail.com

**Murilo Ricardo do Nascimento Arrais  
Carlos Eduardo de Araújo Padilha  
Everaldo Silvino dos Santos**

**ABSTRACT:** Enzymes are commonly used in the food industry, paper, textiles, antifungals, among others. In purification processes of various substances such as enzymes of biotechnological origin, aqueous two-phase systems are widely used. Therefore, the aim of the study was to investigate the stability of pectinase in different salts for the definition of a biphasic aqueous system to be used in the purification of the enzyme. Pectinase was produced by submerged fermentation of *Aspergillus Niger* IOC 4003 using the mangaba depulped residue as the inducer. From stock solutions, extracts were conditioned for 2 h in the presence of 5, 10, 15 and 20% (m / m) of ethanol, ammonium sulfate, dibasic sodium phosphate and sodium citrate. Control assays were performed in the absence of these components, with replacement by deionized water. In relation

to the impact of the salts studied, the presence of the citrate and phosphate salts allowed greater stability in all the percentages used, with a drop in activity around 50%. In the presence of 10% ethanol, the relative activity was 422.81, being higher than that obtained with Citrate and Phosphate respectively 103.40 and 73.42 in the same percentage. For Sulfate, all relative activities obtained in the percentages studied were smaller than in the other trials. Thus, we consider that the stability of pectinase in the salts studied may aid in the selection of suitable phase-forming agents for the partitioning of this enzyme and its purification.

**KEYWORDS:** Pectinase, enzymatic stability, submerged fermentation, biphasic aqueous system.

### INTROUCTION

Enzymes are commonly used in the food industry, paper, textiles, antifungals, among others. In purification processes of various substances such as enzymes of biotechnological origin, aqueous two-phase systems are widely used.

## SPECIFIC OBJECTIVES

The objective of this study was to investigate the stability of pectinase in different salts for the definition of a biphasic aqueous system to be used in the purification of the enzyme.

## MATERIALS AND METHODS

The work was developed at the Laboratory of Biochemical Engineering (LEB), which belongs to the Department of Chemical Engineering (DEQ), located at the Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), in the city of Natal, Rio Grande do Norte. Pectinase was produced by submerged fermentation of *Aspergillus Niger* IOC 4003 using 2g the mangaba depulped residue as the inducer. The medium used for fermentation contains a mineral solution consisting of 2% NaNO<sub>3</sub>; 1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 5% MgSO<sub>4</sub>; 5% KCl; 0.001% FeSO<sub>4</sub>; 0.016% MnSO<sub>4</sub>; 0.012% ZnSO<sub>4</sub> and 86.97% distilled water. From stock solutions, extracts were conditioned for 2 h in the presence of 5, 10, 15 and 20% (m / m) of ethanol, ammonium sulfate, dibasic sodium phosphate and sodium citrate. Control assays were performed in the absence of these components, with replacement by deionized water. Table and figure 1 shows the results of enzyme and control stability at the different concentrations studied.

% Salts	Activity in etanol (U/mL)	Activity in phosphate (U/mL)	Activity in Citrate (U/mL)	Activity in Sulfate (U/mL)
5%	0,0058	0,007	0,0115	0,0083
C5%	0,0065	0,0059	0,0114	0,0238
10%	0,0241	0,0058	0,0091	0,0015
C10%	0,0057	0,0079	0,0088	0,0253
15%	0,0056	0,0073	0,0052	0,0001
C15%	0,0082	0,0069	0,0074	0,0061
20%	0,0044	0,0154	0,0108	0,0001
C20%	0,0114	0,0107	0,0222	0,0353

Table - 1

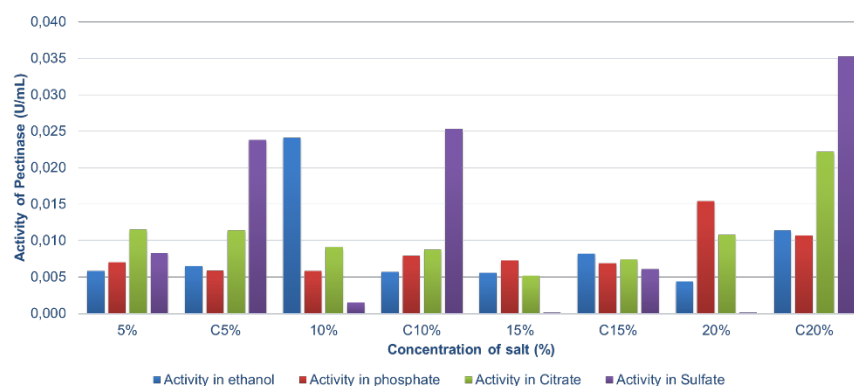


Figure - 1

## RESULTS

In relation to the impact of the salts studied, the presence of the citrate and phosphate salts allowed greater stability in all the percentages used, with a drop in

activity around 50%. In the presence of 10% ethanol, the relative activity was 422.81, being higher than that obtained with Citrate and Phosphate respectively 103.40 and 73.42 in the same percentage. For Sulfate, all relative activities obtained in the percentages studied were smaller than in the other trials.

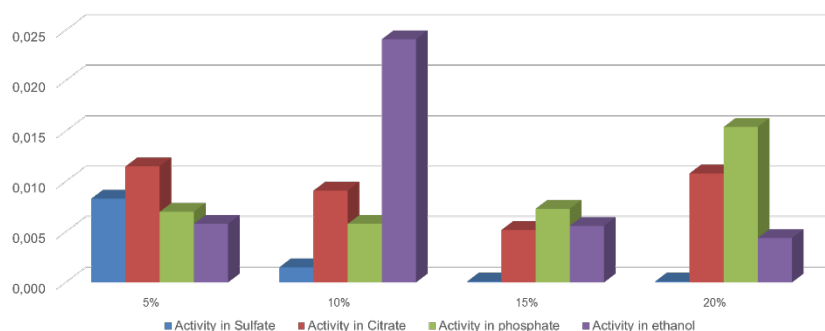


Figure - 2

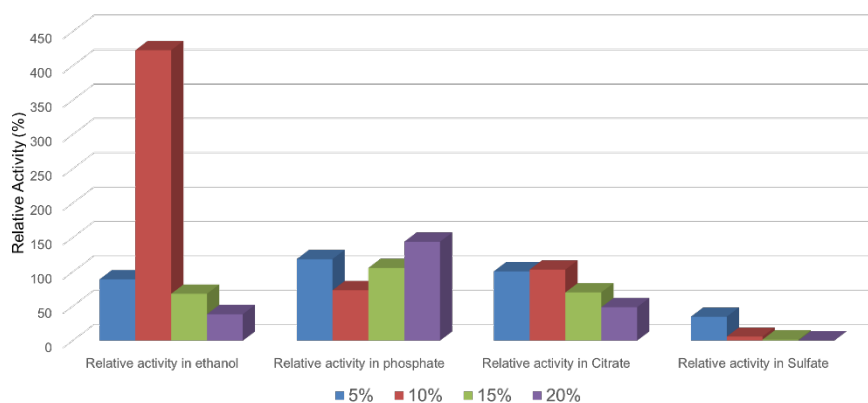


Figure - 3

The Figure 2 and 3 – Enzyme activity values after 2 hours of contact of the extract with the saline solution of the different salts in the proportions studied and Relative activity of the enzyme in the different solutions and proportions studied.

## CONCLUSION

Thus, we consider that the stability of pectinase in the salts studied may aid in the selection of suitable phase forming agents for the partitioning of this enzyme and its purification. We can observe values of higher activities in the presence of citrate and phosphate in the different proportions than in the other solutions studied. In the analysis of the stability of the enzyme in solution with ethanol was observed in the proportion of 10% a high relative activity in comparison with the other proportions. Therefore the citrate and phosphate salts are considered to be most suitable for use in two-phase aqueous systems for purification of *Aspergillus niger* IOC 4003 Pectinase.

## REFERENCE

BEZERRA, M. C. M. Caracterização e avaliação dos óleos extraídos das sementes de melão amarelo



(*Cucumis melo* L.) e mangaba (*Hancornia speciosa*): possibilidade de uso alimentício. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. UFRN, Natal, 2014.

FERREIRA, J. F.; Sbruzzi, D.; Barros, K. V. G., Ehrhardt, D. D., Tambourgi, E. B. Purification of Bromelain Enzyme from Curauá (*Ananas Erectifolius* LB Smith) White Variety, by Aqueous Two-Phase System PEG 4000/Potassium Phosphate, *Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 8, p. 395-399, 2014.

F. Stutzenberger, "Pectinase Production," in *Encyclopedia of Microbiology*, J. Lederberg, Ed., vol. 3, pp. 327–337, Academy press, New York, NY, USA, 1992.

Galinari, E.; Almeida-Lima, J, Macedo, G.R.; Mantovani, H.C.; Rocha, H.A.O. Antioxidant, antiproliferative, and immunostimulatory effects of cell wall  $\alpha$ -d-mannan fractions from *Kluyveromyces marxianus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 109, p. 837-846, 2018.

Gummadi, S.M.; Panda, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases: Review. *Process Biochem.* 2003, 38, 987–996.

## TÉCNICA DE FISH APLICADA NA IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA DE REATOR DE LODO ATIVADO UTILIZADO NA DEGRADAÇÃO DE BLENDA

**Livia Cordi**

Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas, Rua Monteiro Lobato n. 255, CEP 13083-862, Campinas, SP, Brasil

**Nelson Durán**

Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas, Rua Monteiro Lobato n. 255, CEP 13083-862, Campinas, SP, Brasil

**RESUMO:** O tratamento biológico pelo processo de lodos ativados é amplamente aplicado no tratamento de resíduos, pois sua microbiota é capaz de biodegradar compostos orgânicos e romper cadeias poliméricas. A poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) é parcialmente biodegradado e para aumentar a degradação, é recomendado processar uma blenda contendo polímero natural, como o amido. O processo de lodo ativado tem sua microbiota alterada dependendo da fonte de carbono utilizada, para isto, a técnica molecular FISH é aplicada para identificar e enumerar grupos específicos de microrganismos, detectando elementos genéticos em amostra de fluorescência por sondas específicas e microscopia de fluorescência. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade da microbiota do lodo ativado em biodegradar filmes de PCL e blendas de PCL/amido e verificar por FISH os grupos de microrganismos. A proporção da

blenda foi 35% em massa de amido, 15% em massa de plastificante Edenol e 50% de PCL. A biodegradação ocorreu em reator, contendo os filmes poliméricos à temperatura ambiente por 120 dias. A biodegradação foi avaliada por MEV (microscopia eletrônica de varredura), MFA (microscopia de força atômica) e TGA (termogravimetria). A perda de massa para o filme de PCL foi de 41%, enquanto que a blenda teve uma redução de 84%. A microbiota variou durante a biodegradação dos polímeros, apresentando sinal positivo de fluorescência para Gammaproteobacteria, Firmicutes e Mycobacterium na biodegradação do PCL, e Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria para a blenda. Diante dos resultados, conclui-se que o tratamento biológico por lodo ativado é um processo promissor nos estudos de biodegradação de polímeros.

**PALAVRAS-CHAVES:** Lodo ativado, Biodegradação de polímeros, FISH

### FISH ANALYSIS APPLIED TO IDENTIFICATION OF ACTIVATED SLUDGE MICROBIOTA USED FOR BLEND BIODEGRADATION

**ABSTRACT:** Biological treatment by activated sludge process has been widely used to industrial effluents, because their microbiota is

able to degrade different organic compounds. Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) are partial degraded by microorganism, to accelerate the biological attack to PCL is the addition of natural polymers like starch. Fluorescent in situ hybridization (FISH) is a technique that is used to identify and enumerate specific microbial groups and is used to detect specific genetic elements in a sample. The aim of this study is identify, by FISH, the activated sludge microbiota responsible to biodegradation of PCL and their blend with starch. The blend proportion was 35% (w/w) starch, 15% (w/w) plasticizer and the 50% (w/w) PCL. Aerobic biodegradation was performed in a batch reactor, containing PCL and PCL/starch blend films, at room temperature under constant aeration for until 120 days. The biodegradation process was observed by atomic force microscopy (AFM) scanning electron microscopy (SEM) and thermogravimetric analysis (TGA). The FISH analysis was carried out using different probes specific for Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Actinobacteria, Archaea, Firmicutes, Chloroflexi, *Mycobacterium* and Eukaria. It was observed a low mass reduction in 84 % to the blend PCL/starch and 41% to PCL film. FISH results show that the microbiota suffered variation under PCL biodegradation process and it was observed positive fluorescent signal for Gammaproteobacteria, Firmicutes, and *Mycobacterium*. To PCL/starch blend biodegradation the positive results were for Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria. The activated sludge was a very promising process to study the biodegradation as observed in this work.

**KEYWORDS:** Activated sludge, polymer biodegradation, FISH

## 1 | INTRODUÇÃO

O desenvolvimento para o conforto e o bem-estar humano produzido a partir da Revolução Industrial levou à intensificação do material descartado, ocasionando aumento da quantidade de resíduos gerados, provocando contaminação do meio ambiente e trazendo riscos à saúde humana. O aumento da produção de bens de consumo incrementa também a quantidade de rejeitos originados na extração das matérias-primas, fabricação, utilização e descarte de produtos (Valt, 2007).

Os plásticos são considerados os grandes vilões ambientais, pois podem demorar séculos para se degradar e ocupam grande parte do volume dos aterros sanitários, interferindo de forma negativa nos processos de compostagem e de estabilização biológica. Além disso, os resíduos poliméricos quando descartados em lugares inadequados, como lixões, rios, encostas, etc., causam impacto ainda maior ao meio ambiente.

Deste modo, surgem as propostas de redução, reaproveitamento e até mesmo biodegradação desses resíduos plásticos em diferentes sistemas biológicos, dentre eles, o lodo ativado. O sistema de lodos ativados é amplamente utilizado, para o tratamento de despejos domésticos e industriais, em situações em que uma elevada quantidade do efluente e reduzidos requisitos de área são necessários. Basicamente,

compreende um tanque de aeração, tanque de decantação e recirculação de lodo. A biomassa consegue ser facilmente separada no decantador devido à formação de flocos, no qual estão presentes bactérias heterotróficas aeróbias, autotróficas nitrificantes, heterotróficas desnitrificantes, filamentosos e protozoários, envolvidos em uma matriz de polissacarídeos (Von Sperling, 2002).

Para assegurar a estabilidade e eficiência de um sistema de tratamento biológico, o conhecimento da dinâmica da comunidade microbiana presente no lodo e sua correlação com os parâmetros operacionais do sistema são fundamentais (Schneider et al., 1998; Kaiser et al., 1998). Comunidades microbianas podem ser consideradas como unidades funcionais que são caracterizadas pela soma das propriedades metabólicas e pelos grupos taxonômicos microbianos envolvidos.

Nos últimos anos se desenvolveram técnicas baseadas no DNA que permitiram estudar os microrganismos do meio ambiente independentemente da realização de cultivo em laboratório. São ferramentas muito poderosas que tem permitido um grande avanço no conhecimento da diversidade microbiana.

A ecologia microbiana molecular é baseada na compreensão das relações entre microrganismos e suas interações com o ambiente, através da análise de moléculas representativas de organismos ou de processos por eles desencadeados. Estas podem ser proteínas, enzimas ou ácidos nucleicos, como RNA (ácido ribonucléico) e DNA (ácido desoxirribonucléico). A extração de DNA de amostras ambientais, com posterior amplificação e análise do material genético, tem sido uma alternativa ou complemento ao clássico método de cultivo e análises fisiológicas de microrganismos.

Na última década, a hibridização *in situ* com sondas fluorescentes (FISH) complementares ao RNA ribossômico (rRNA) tem se afirmado como ferramenta útil para a análise taxonômica de bactérias em comunidades complexas, (Amann et al., 1995), sendo que a comparação da composição de duas comunidades bacterianas pode ser realizada adequadamente utilizando sondas de diferentes níveis taxonômicos (Manz et al., 1994). Esta técnica permite a detecção e enumeração de células bacterianas mediante o emprego de sondas que são marcadas com um radioisótopo para uma parte específica do 16S rRNA de uma bactéria. Uma sonda consiste de 15 a 30 nucleotídeos (bases), complementares ao DNA alvo. A sonda marcada com substâncias fluorescentes ou fluoróforos permite a visualização por microscopia de epifluorescência das células de um dado tipo de bactéria. Os fluoróforos mais empregados em FISH são a fluoresceína e seus derivados, tetrametilrosamina, Alexa488, Cy3, Cy5, entre outras. Visto que é uma técnica sem extração de ácidos nucleicos da célula, é conhecida também como hibridização de células inteiras, em inglês “whole cell hybridization”.

Utilizando análise FISH, tipos específicos ou grupos de bactérias podem ser observados sob uma microscopia fluorescente e neste sentido a presença bem como a quantidade de dada bactéria na amostra de lodo pode ser investigada (Jetten et al., 2001). A análise FISH consiste em uma importante ferramenta para acompanhar

o desenvolvimento de populações microbianas nos biorreatores estudados (Persson et al., 2002; Toh et al., 2002). A técnica permite não somente determinar o número, a morfologia e o tipo de microrganismos cultivados ou não, permitindo também analisar sua distribuição espacial (Amann et al., 1995; 2000).

O sistema de lodos ativados, assim como outros ecossistemas também tem restrição pelo método de caracterização tradicional que depende do cultivo das bactérias, sendo que o número de organismos viáveis é subestimado. A estratégia para caracterizar a estrutura nesses ecossistemas consiste na aplicação de sondas gerais, não específicas direcionadas a grandes grupos e logo na sequência ir aplicando sondas específicas para grupos mais reduzidos. As bactérias da divisão Proteobacteria são frequentemente as mais isoladas desse ecossistema. Dentro do grupo ainda foram detectadas alfa Proteobacterias, beta Proteobacterias, gamma Proteobacterias, delta e épsilon Proteobacterias. A técnica de FISH tem sido muito aplicada para a caracterização de lodos de sistemas nitrificantes nos quais *Nitrosococcus mobilis* é predominante como oxidadora de amônio e os resultados confirmados pelas técnicas de contagem e isolamento (Juretschko et al, 1998).

As técnicas de biologia molecular são muito úteis na hora de estudar comunidades complexas como as que se encontram em reatores e sistemas de tratamento de águas e esgotos, pois permitem o conhecimento da estrutura da comunidade e de sua dinâmica populacional.

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade da microbiota do lodo ativado em biodegradar filmes de PCL e blendas de PCL/amido e verificar por FISH os grupos de microrganismos.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Materiais Poliméricos

Para obter a blenda biodegradável foram utilizados Poli(caprolactona) (PCL) P-787 (Union Carbide do Brasil), Amido de Milho Modificado SNOW-FLAKE® 064051 (Corn Products, Brasil) e o plastificante Edenol® 3203 (Cognis do Brasil). PCL, Amido e Edenol forma utilizados na proporção 50:35: 15, respectivamente.

### 2.2 Perda de Massa

A perda de massa durante o processo de biodegradação foi avaliada pelo cálculo da porcentagem de peso perdido (Franco, 2004), seguindo a equação 1 (Onde,  $M_o$  = massa inicial;  $M_f$  = massa final):

$$\text{Perda de Massa (\%)} = \frac{M_o - M_f \cdot 100}{M_o}$$

## 2.3 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia do filme de PCL e da Blenda foi avaliada utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura modelo Jeol - JSM-6360LV, operando a 20 keV com detector de elétrons secundários e retroespalhados. As amostras foram secas sob vácuo dinâmico, metalizadas com uma fina camada (14nm) de ouro/paládio por Sputtering (evaporação do metal e deposição de uma fina camada sobre a amostra) utilizando-se um metalizador BAL-TEC.

## 2.4 Microscopia de Força Atômica (AFM)

As microscopias de força atômica foram realizadas em microscópio SPM-9600 Shimadzu (Kyoto, Japan) e as imagens foram obtidas utilizando o modo dinâmico. Foi utilizado cantilever comercial de silicone e a frequência de ressonância da ponta foi de 210–230 khz.

## 2.5 Análise Termogravimétrica (TGA)

No estudo de TGA foi utilizado um Thermogravimetric Analyser TGA 2050 da TA Instruments utilizando-se uma taxa de aquecimento de 20°C/min, uma faixa de temperatura entre 30 e 900°C e um fluxo de nitrogênio de 20mL/min. A massa das amostras de PCL e PCL/amido analisadas foi de  $7 \pm 1$  mg e a massa do amido foi de 4 mg.

## 2.6 Biodegradação em sistema de lodo ativado

A biodegradação do polímero foi realizada em reator de fluxo contínuo de lodo ativado. Para a partida do reator biológico foi feita caracterização do inóculo e posterior adaptação do mesmo aos polímeros. O sistema é constituído de uma unidade aeróbia e cilíndrica com capacidade volumétrica de 2,5 L, na qual ocorre a entrada do efluente a ser tratado. Esta unidade apresenta-se conectada à parte inferior de um decantador anaeróbio, cônico cuja capacidade volumétrica é de 1,5 L, no qual há a separação da biomassa do efluente tratado (Cordi et al., 2007). Ambas as unidades são construídas em acrílico. A biodegradação em reator de lodo ativado foi realizada até 120 dias. O controle da perda de massa sem inóculo da microbiota foi realizado em um recipiente com água destilada e aeração.

## 2.7 FISH

No FISH quantitativo se determinou a abundância relativa de certos grupos de bactérias como porcentagem do número total de células (utilizando corantes como o DAPI que se ligam ao DNA genômico e tingem todas as células) ou como porcentagem do número de bactérias do domínio Bacteria, utilizando a sonda geral EUB338. O estudo da relação de número de células EUB/DAPI nos deu uma ideia aproximada da



proporção de células bacterianas metabolicamente ativas. As células que se tingem somente com DAPI e não com a sonda podem estar mortas ou metabolicamente inativas. O ecossistema estudado pode apresentar Archaeas e para isto foi utilizada a sonda ARCH915. As amostras de lodo retiradas para análise FISH foram previamente guardadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . As sondas utilizadas foram: Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Actinobacteria, Archaea, Firmicutes, Chloroflexi, Mycobacterium e Eukaria. As amostras foram observadas em microscópio Zeiss AXIO IMAGER A2 equipado com Zeiss AXIOCAM MRC e AXIOVISION 4.8 software.

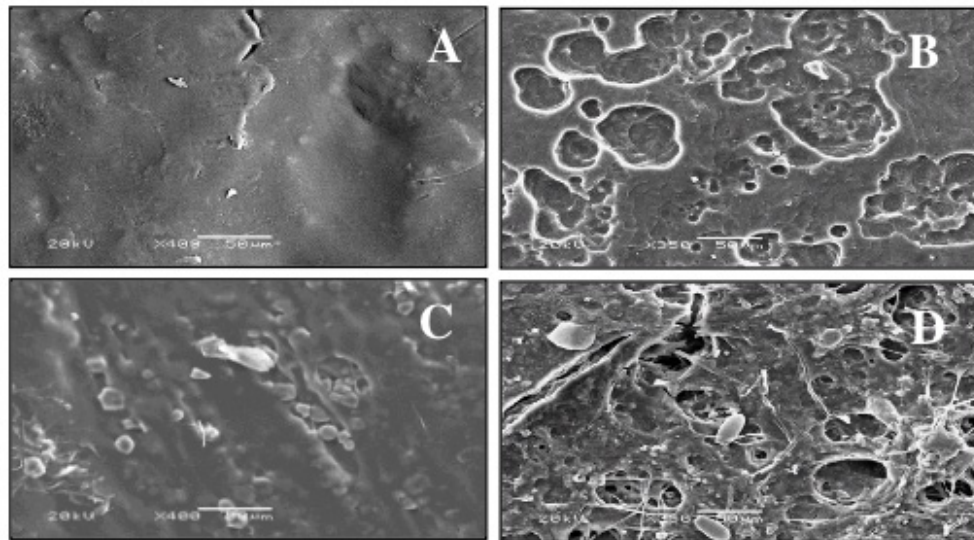
### 3 | RESULTADOS

Os filmes de PCL e a blenda PCL/Amido/Edenol tiveram sua perda de massa analisada em 60 e 120 dias. A blenda apresentou maior taxa de biodegradação quando comparada ao filme de PCL independente do período analisado. Na Tabela 1, é mostrado o resultado obtido para perda de massa em porcentagem com os respectivos desvios.

Amostras	Perda de Massa (%)	
	60 dias	120 dias
Blenda de PCL/amido/Edenol	37% ( $\pm 3\%$ )	85% ( $\pm 8$ )
Filme de PCL/Edenol	15% ( $\pm 2$ )	38 ( $\pm 5$ )

Tabela 1. Perda de massa para a blenda (A) e para o filme de PCL (B) em lodo ativado.

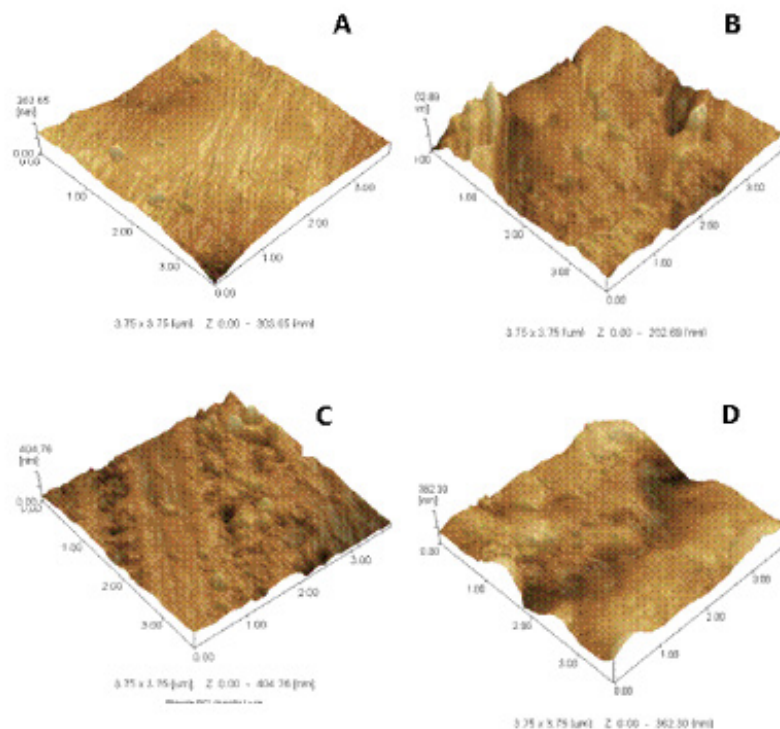
Em 120 dias de biodegradação, a taxa máxima obtida para o filme de PCL foi de aproximadamente 38%, enquanto que para a blenda observou-se uma taxa de 85% de biodegradação. Observou-se ainda que após 60 dias de biodegradação em lodo ativado, a perda de massa passou a ser significativa para a blenda. Ao decorrer do processo de biodegradação, a superfície dos filmes de PCL apresenta mais pontos de ataque e aprofundamento das cavidades até união destas cavidades quando analisada por MEV. Em 120 dias, o filme apresenta estiramentos que possivelmente levam a fragilidade do filme. Apesar da perda de massa do filme de PCL em 120 dias não ultrapassar os 38%, pela microscopia é observada uma mudança significativa em sua superfície, indicando o potencial de degradação desta formulação pela microbiota do lodo ativado. Cada cavidade que se forma é aprofundada e se aproximam de tal forma que a matriz de PCL se torna reduzida, indicando a degradação desta porção da blenda, corroborando assim com o resultado da alta taxa de biodegradação apresentada neste período (84%).



**Figura 1.** Microscopias de MEV antes e depois dos 120 dias de biodegradação. (A) Filme de PCL antes da biodegradação, (B) filme de PCL após biodegradação. (C) Blenda antes da biodegradação, (D) Blenda após biodegradação.

A microscopia de força atômica constitui uma ferramenta extremamente poderosa para o estudo da morfologia da superfície polimérica da distribuição de fases em sistemas multicomponentes. Sua principal vantagem sobre a microscopia eletrônica de varredura está no fato de não ser necessária qualquer preparação prévia da amostra a ser analisada.

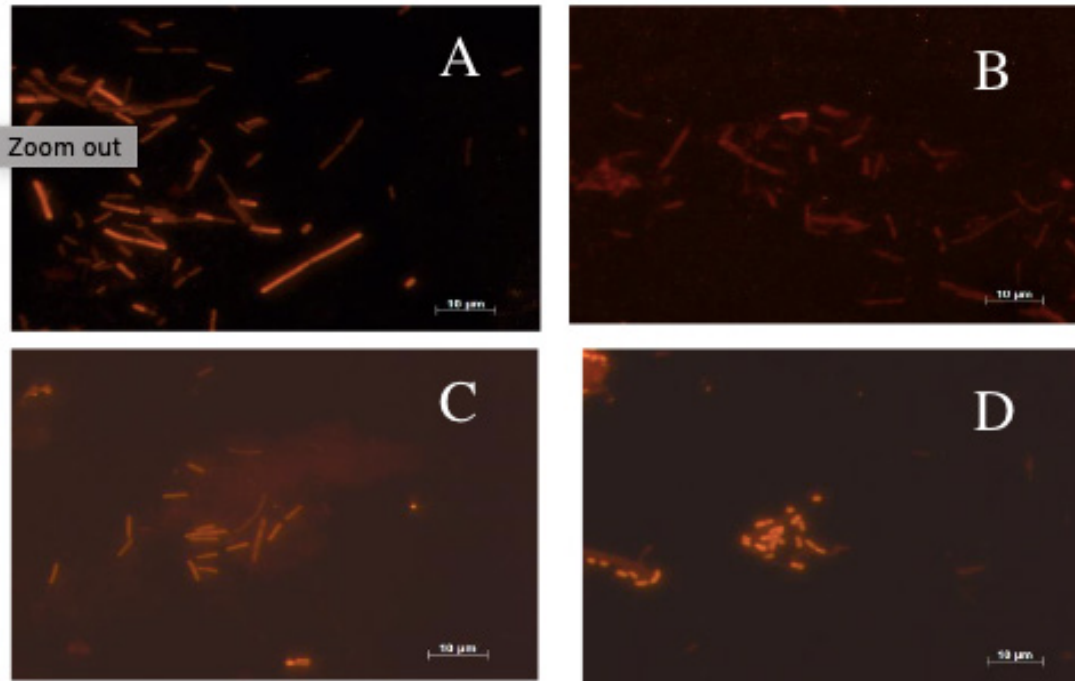
A presença dos grãos de amido nas formas esféricas e dispersas irregularmente pela superfície do filme, resultando numa blenda heterogênea. Este resultado indica a importância da AFM em avaliar a miscibilidade da blenda polimérica.



**Figura 2.** Microscopias tridimensionais de força atômica antes e depois dos 120 dias

de biodegradação. (A) Filme de PCL antes da biodegradação, (B) filme de PCL após biodegradação. (C) Blenda antes da biodegradação, (D) Blenda após biodegradação.

A microscopia de Fluorescência revelou a presença de vários grupos de bactérias através da análise da morfologia.



**Figura 3.** Detecção de diversas morfologias bacterianas presente no reator de lodo ativado utilizando FISH para o filme de PCL biodegradado: LGC (A), LMP (B); e para a blenda biodegradada: ALPHA (C), GAMMA (D).

A microscopia de epifluorescência revelou a presença de Alpha (ALP), Beta (BET), Gammaproteobacteria (GAMA) para a microbiota do lodo ativado após a biodegradação da blenda. A presença de GAMA, LGC e LMP foram detectadas para as amostras de lodo após a biodegradação do filme de PCL.

Amostras Biodegradadas / Sonda	ALFA	BETA	GAMA	LGC (A, B E C)	LMP
PCL biod. 60 dias	-	-	+	+	+
PCL biod. 120 dias	-	-	+	+	-
Blenda biod. 60 dias	+	+	-	-	-
Blenda biod. 120 dias	+	+	+	-	-

Tabela 2. Presença e ausência de grupos de microrganismos de acordo com a sonda utilizada nas amostras de lodo ativado.

Na figura 4 pode-se observar a análise da TGA que apresenta porções de redução

da blenda após 120 dias de biodegradação em reator de lodo ativado.

O PCL é observado até o final do processo de biodegradado por ser mais cristalino e de degradação mais lenta pelo sistema biológico. O plastificante edenol e o amido por serem de fontes naturais são facilmente biodegradados.

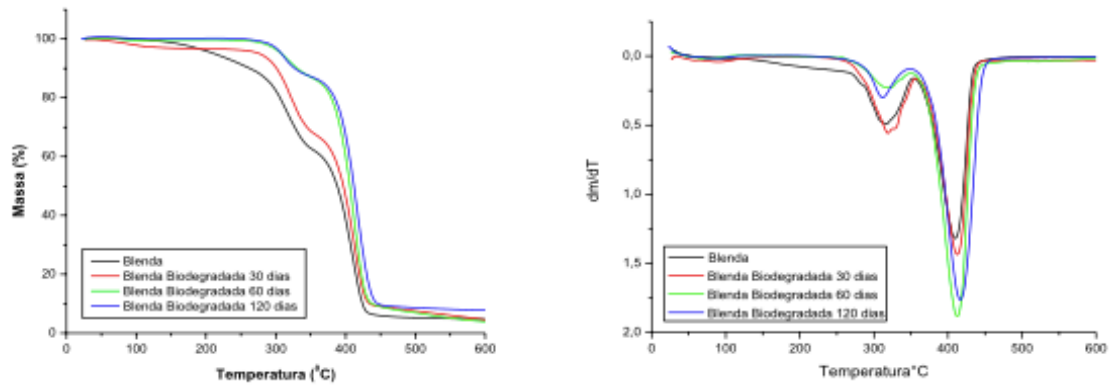


Figure 4: Curva de TGA e sua derivada apresentando a blenda biodegradada em diferentes tempos.

Na curva da derivada é nitidamente observada a redução das primeiras curvas de degradação com velocidade máxima de degradação térmica ao redor de 300°C evidenciando a biodegradação das frações de edenol e amido. Há uma tendência para aumento da estabilidade térmica para as amostras da blenda biodegradação em 60 e 120 dias por que ocorre uma exposição do PCL aumentando sua fração quando diminui significativamente as frações de amido e edenol.

## 4 | CONCLUSÃO

A perda de massa para o filme de PCL foi de 41%, enquanto que a blenda teve uma redução de 84%, devido a presença do amido que torna o material com maior taxa de biodegradação.

As imagens obtidas tanto pela MEV como pela AFM auxiliaram na confirmação de degradação dos materiais, filme de PCL e da blenda, no tempo de degradação de 120 dias, onde a biomassa microbiana do lodo ativado adere ao filme e inicia o processo de biodegradação consumindo inicialmente o amido e posteriormente o plastificante edenol e desestabilizando as cadeias de PCL.

A microbiota variou durante a biodegradação dos polímeros, apresentando sinal positivo de fluorescência para Gammaproteobacteria, Firmicutes e Mycobacterium na biodegradação do PCL, e Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria para a blenda. Diante dos resultados, conclui-se que o tratamento biológico por lodo ativado é um processo promissor nos estudos de biodegradação de polímeros em meio líquido.

O estudo das análises de TGA com o uso das derivadas das curvas facilita muito a visualização do comportamento térmico dos polímeros e plastificante utilizados.

assim com a interação que ocorre entre os mesmos. Esta ferramenta auxilia também a observar a redução ou aumento da estabilidade térmica das curvas em relação aos filmes processados e biodegradados. De acordo com as derivadas das curvas para todos os filmes estudados foi observado que para os materiais biodegradados ocorre sempre um ganho de estabilidade térmica para os filmes biodegradados em 120 dias, o que indica a massa residual predominante de PCL, sendo este mais cristalino e com maior estabilidade térmica em relação aos outros componentes da blenda e dos compósitos.

## REFERÊNCIAS

Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K-L. **Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation**. Microbiol. Rev. 59: 143-169, 1995.

Amann, R.I.; Ludwig, W. Ribossomal **RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology**. FEMS Microbiol Rev, 24, 555-565, 2000.

Amann, R.I.; Ludwig, W.; Schleifer, K.H.. **Phylogenetic identification and in situ detection of individual cells without cultivation**. Microbiol Rev, 59, 143-169, 1995.

Cordi, L., Almeida, E.S., Assalin, M.R., Durán, N. **Intumescimento filamentoso no processo de lodos ativados aplicado ao tratamento de soro de queijo: caracterização e uso de floculantes para melhorar a sedimentabilidade**. Engen Ambiental: Pesq Tecnol, 4, n.2, 29-37, 2007.

Franco, C.R, Cyras, V.P., Busalmen, J.P., Ruseckaite, R.A., Vasquez, A., **Degradation of polycaprolactone/starch blends and composites with sisal fibre**. Polymer Degradation and Stability, V.86, p.95-103, 2004.

Jetten, M. S. M.; Van Dongen, L. G. J. M.; Van Loosdrecht, M. C. M.. **“The Combined Sharon/Anammox Process”**. Stowa: Foundation for Applied Water Research. IWA Publishing. London. 2001.

Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K-H., Pommerening Röser, A., Koops, H-P., Wagner, M. **Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: Nitrosococcus mobilis and Nitrospira-like bacteria as dominant populations**. Appl Environ Microbiol, 64, 3042-3051, 1998.

Kaiser, S.K., Guckert, J.B, Gledhill, D.W., **Comparison of activated sludge microbial communities using Biolog microplates**. Water Sci. Tech., v. 37, n.4-5, p.57-63, 1998.

Manz, W., Wagner, M., Amann, R., Schleifer, K-L. **In situ characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants**. Wat. Res., v. 28, n.8, p.1715-1723, 1994.

Persson, F.; Wik, T.; Sörensson, F.; Hermansson, M.. **“Distribution and activity of ammonia oxidizing bacteria in a large full-scale trickling filter”**. Water Research, 36, pp. 1439-1448. 2002.

Schneider, C.A., Mo, K., Liss, S.N. **Applying phenotypic fingerprinting in the management of wastewater treatment systems**. Water Sci. Tech., v. 37, n.4 - 5, p.461-464, 1998.

Toh, S.K.; Webb, R.I.; Ashbolt, N.J.. **“Enrichment of Autotrophic Anaerobic Ammonium-oxidizing Consortia from Various Wastewaters”**. Microbial Ecology, 43, pp.154-167. 2002.

VALT, R.B.G. **Ciclo de vida de embalagens para bebidas no Brasil**. Ed. Thesaurus, Brasília/DF,

2007.

Von Sperling, M.. “**Princípio do Tratamento Biológico de Águas Residuárias – Lodos Ativados**”.  
Vol. 4. 2ª edição. Editora FCO. UFMG. Belo Horizonte. Minas Gerais. 2002.



## TEMPERATURE AND PH EFFECTS ON THE ACTIVITY AND STABILITY OF THR XYLANASES PRODUCED BY THE THERMOPHILIC FUNGUS *Rasamsonia emersonii* S10

### Jéssica de Araujo Zanoni

Biosciences, Languages and Exact Sciences Institute, State University of São Paulo (IBILCE-UNESP), São José do Rio Preto SP, Brazil

### Eleni Gomes

Biosciences, Languages and Exact Sciences Institute, State University of São Paulo (IBILCE-UNESP), São José do Rio Preto SP, Brazil

### Gustavo O. Bonilla-Rodriguez

Biosciences, Languages and Exact Sciences Institute, State University of São Paulo (IBILCE-UNESP), São José do Rio Preto SP, Brazil

**ABSTRACT:** The xylanolytic complex consists of extracellular enzymes, mainly produced by fungi and bacteria, which hydrolyze the  $\beta$  (1-4) linkages of xylan. The degradation of this polysaccharide constituent of hemicellulose results in monomers of xylo-oligosaccharides subsequently converted into xylose. These enzymes have many industrial applications, being potential targets for research. This project aimed to characterize the xylanases present in the crude extract produced by the thermophilic fungus *Rasamsonia emersonii* S10 in solid state cultivation with respect to temperature and pH. Assays were performed to evaluate the effect of pH and temperature on enzyme activity, determining the optimum conditions and the stability of the enzymes. Optimal pH

values were obtained at 5.5 and 7, and 80 °C as optimum temperature for 4 minutes incubation. Regarding thermal stability, the highest stability values occurred in the range from 4 to pH 5.5, and for incubation times of 30 and 40 minutes at 50 °C in the absence of the substrate.

**KEYWORDS:** Enzyme; xylanase; thermophilic fungi, bioethanol.

## 1 | INTRODUCTION

Enzymes are obtained from different natural sources, including plants and animals, but the microorganisms capable of growing in a wide diversity of environments are the preferred source of enzymes for the industry. Among these stand out the fungus for this purpose because of their ease of production and enzymes that can be extracted without the need for cell lysis (HALTRICH et al., 1996).

The agro-industrial wastes are potential sources of substrates for enzymatic degradation, including bagasse from sugarcane, corn cobs, sawdust, and other lignocellulosic materials rich in cellulose and hemicellulose present in the plant walls, which are considered important sources of sustainable energy (PAYNE et al., 2015).

The wide use of enzymes from xylanolytic complexes in industrial processes (NIEHAUS et

al., 1999) demands further studies to characterize these enzymes not only in the isolated or pure form, but also the enzyme complex present in the crude extract obtained after cultivation process of microorganisms.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

The strain of the thermophilic fungus *Rasamsonia emersonii* S10 was obtained at the Laboratory of Applied Biochemistry and Microbiology of Biosciences, Languages and Exact Sciences Institute, State University of São Paulo (IBILCE-UNESP).

Solid State Cultivation (SSC) was performed in polypropylene bags, adapted to provide the conditions necessary for cultivation. Agar discs colonized by the fungus (one disk of 10 mm in diameter for every 10 mL of nutrient solution) was inoculated into 5 g of a mixture of sugarcane bagasse, wheat bran, corn stover (1:1:1 w/w). To this mixture was added 20 mL of nutrient solution (providing an initial moisture content of about 70%) consisting of (g/L):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (3.5);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (3.0);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.5);  $\text{CaCl}_2$  (0.5), Tween 80 (10.0) and adjusted to pH 5.0. Cultivation occurred in an incubator set at 55 °C for 144 hours. After reaching the cultivation time, enzymatic extraction was done by adding 50 mL of distilled water (1:10 w/v) to each culture vessel and transferred to an orbital shaker kept at 150 rpm for 40 minutes. The crude extract was clarified by vacuum filtration and by centrifuging at 10,000  $\times g$  at 4 °C for 30 minutes. The supernatant was used as enzyme solution and stored at -80 °C.

The enzyme assays used 225 mL of substrate (sodium acetate buffer 0.2M pH 5.0 + 1% Beechwood xylan) added to 25 mL of crude enzyme solution, and incubated in a water bath in test tubes at 50 °C for 4 minutes, in order to measure the initial rate  $V_0$ . After that time the reaction was stopped by adding 250 mL of DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) measuring the release of reducing sugars (MILLER, 1959). One unit of enzyme activity (U) is the amount of enzyme required to release 1 mmol of reducing sugar per minute (NC-IUB, 1979).

For determination of the optimum pH, the xylanolytic activity was assessed by incubating 0.1 mL of crude enzyme solution in 0.9 mL of a xylan suspension (1 %) at different pH values at 50 °C for 10 minutes. The following buffers (0.2 M) were used: Citrate (pH 3 to 3.5), acetate (pH 4, 4.5, 5, 5.5), MES (pH 6, 6.5, 7), Tris (pH 7.5 and 8) and glycine (pH 8.5, 9 and 9.5) the pH of the buffer was adjusted when necessary to correct the displacement effect of the temperature on the pKa (APPLICHEM, 2008).

For optimum temperature determination, xylanolytic activity was tested as a function of the incubation temperature from 30 to 90 °C as described above at the optimum pH.

To analyze the stability of the enzymes in relation to pH, a final volume of 1 mL of the crude extract suitably diluted 1:1 (v/v) in a buffer was incubated for 24 hours at 24 °C in 0.2 M buffers in the absence of the substrate. After the incubation period, the enzyme activity was determined as described previously, compared to a control diluted

1:1 with deionized water.

Thermal stability was analyzed by incubating the enzyme solution in the absence of the substrate for 2, 5, 10, 20, 30 and 40 min. at temperatures between 30 and 90 °C, followed by the enzyme assay at the optimum pH.

### 3 | RESULTS AND DISCUSSION

The crude extract display five xylanases when analyzed by zymography (results not shown). Concerning the effect of pH, within the range of pH values examined two peaks of higher activity were evident at 5.5 and 7.0, which could be ascribed to functional heterogeneity among the isoenzymes (Figure 1A). In terms of the pH stability variation was observed that the enzyme retained 70 % or higher activities in the range from 4.0 to 8.0, showing values higher than 100 % between 4.0 and 5.5 (Figure 1B).

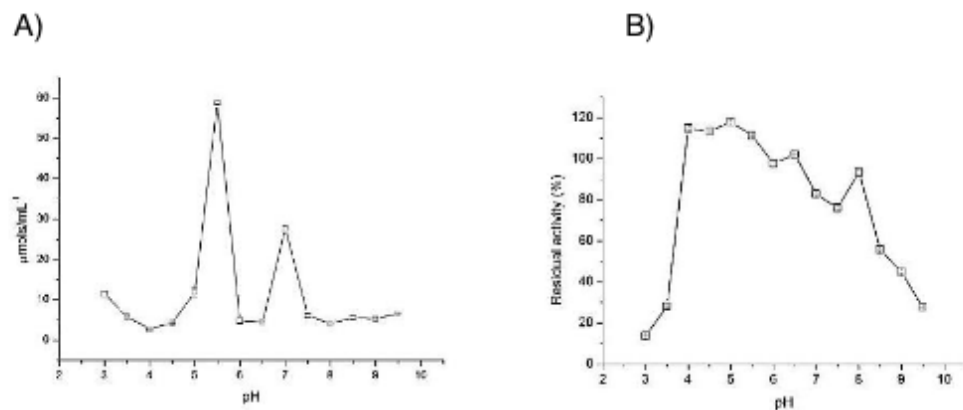


Figure 1. Effect of pH on xylanolytic activity. A) optimum pH; B) enzyme stability.

A xylanase produced by SSC by the mesophilic fungus *Aspergillus fumigatus* displayed an optimum pH of 5.5 (PULS et al., 1999), and for a xylanase produced by *Aspergillus niger*, were described two peaks of pH, at 5.0, and 7.7 (PEREIRA, 2013).

The optimum temperature was achieved at 80 °C, decreasing at 90 °C (Figure 2A). Concerning thermal stability in the absence of the substrate, the highest activities were obtained at 50 °C for incubation times of 30 and 40 minutes (Figure 2B).

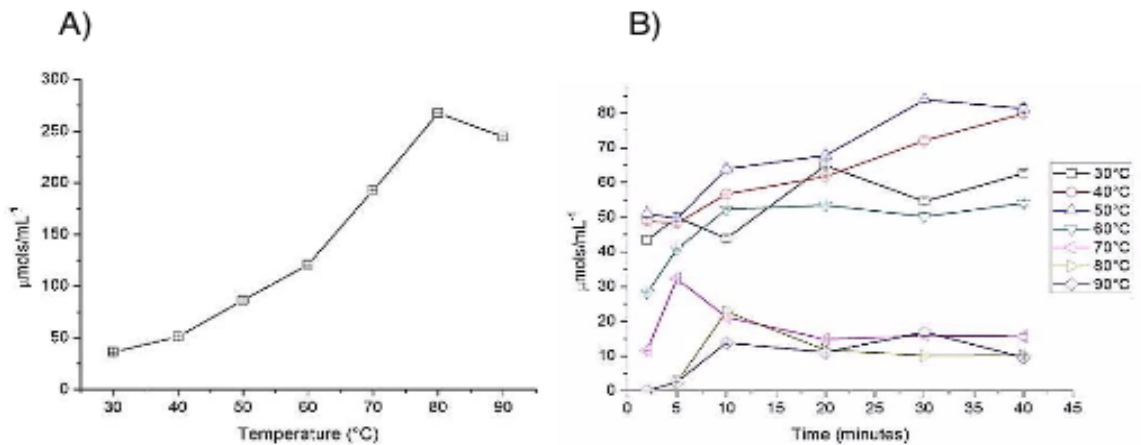


Figure 2. Effect of the temperature on xylanolytic activity. A) Optimum temperature. B) Thermal stability.

The same optimum temperature value was reported for the crude extract produced by the thermophilic fungus *R. emersonii* (then still classified as *Talaromyces emersonii*) (TUOHY; COUGHLAN, 1992) and for a xylanase produced by the fungus *Chrysosporthe cubensis* (GOMES, 2014), with the highest activity values for the thermal stability in the temperature range between 65 and 80 °C.

## 4 | CONCLUSIONS

The results shown here displaying interesting characteristics for the crude extract that motivate us to carry out a study of the isolated forms.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) Finance Code 001

## REFERENCES

APPLICHEM. **Biological Buffers**. APPLICHEM: 18 p. 2008.

GOMES, S. K. **Purificação e Caracterização de Xilanases do Fungo *Chrysosporthe cubensis* e Utilização na Hidrólise de Bagaço de Cana-de-açúcar**. 2014. 59 (Master). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil.

HALTRICH, Dietmar et al. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, v. 58, n. 2, p. 137-161, 1996.

MILLER, Gail Lorenz. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

NC-IUB. Units of Enzyme Activity. **European Journal of Biochemistry**, v. 97, n. 2, p. 319-320, 1979.

NIEHAUS, F. et al. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 51, n. 6, p. 711-729, 1999.

PAYNE, Christina M. et al. Fungal cellulases. **Chemical reviews**, v. 115, n. 3, p. 1308-1448, 2015.

PEREIRA, P. E. D. **Análise de celulases e xilanases por fungo isolado a partir do Bioma Cerrado**. 2013. (Master). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brazil.

PULS, Jurgen et al. Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 2, p. 114-119, 1999.

TUOHY, M. G.; COUGHLAN, M. P. Production of thermostable xylan-degrading enzymes by *Talaromyces emersonii*. **Bioresource Technology**, v. 39, n. 2, p. 131-137, 1992.

## TRIAGEM DE TRATAMENTO DE *Luffa cylindrica* PARA IMOBILIZAÇÃO DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* VISANDO A PRODUÇÃO DE INVERTASE

### **Beatriz Paes Silva**

Universidade Estadual de Maringá, Bioquímica.  
Maringá-PR

### **Brenda Kischkel**

Universidade de São Paulo, Biologia.  
São Paulo - SP

### **Nicolle Ramos dos Santos**

Centro Universitário de Maringá, Engenharia química.  
Maringá – PR

### **André Álvares Monge Neto**

Universidade Estadual de Maringá.  
Maringá-PR

**RESUMO:** A técnica de imobilização tem se tornado uma alternativa para processos industriais. A *Saccharomyces cerevisiae* sintetiza a enzima invertase, utilizada na indústria alimentícia para a produção de açúcar invertido, que é a matéria-prima que garante a textura adequada ao produto final. O presente trabalho objetivou a realização da triagem de quatro tratamentos para imobilização de *S. cerevisiae* sendo *Luffa cylindrica*, um bio-suporte, visando a produção de invertase. No primeiro lote de tratamento foi utilizada solução de hidróxido de sódio a 2% e mantido sob agitação a 120RPM por 24hs. O segundo lote foi autoclavado a 123°C a 1,3kgf/cm<sup>2</sup>, já o terceiro lote foram aplicados ambos os tratamentos. O quarto lote foi utilizado para

controle. Os lotes foram inoculados com a levedura e fermentados com bicarbonato de sódio (0,15 mol/L) para a produção de invertase. A quantificação de microrganismos aderidos ao suporte foi realizada por contagem de câmara de Neubauer, a quantificação de proteínas foi realizada pela técnica de biureto e a medida da atividade de extrato bruto contendo invertase foi mensurada pela técnica de DNS. O segundo e o terceiro lote apresentaram resultados semelhantes ao controle com 0,95% de aderência de células à bucha. O primeiro lote apresentou 2,15 % de aderência das células e produziu enzimas com atividade de 0,6 mol.L<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>. Mesmo tendo um percentual de aderência bem menor (0,95%), as enzimas provenientes do tratamento controle apresentaram atividade 0,12 mol.L<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>, mostrando que esponja vegetal é um bom bio-suporte para imobilização dessa levedura mesmo sem tratamento.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Saccharomyces cerevisiae*, bucha vegetal, imobilização, fermentação.

### LUFFA CYLINDRICA TREATMENT TREATMENT FOR IMMOBILIZATION OF *Saccharomyces cerevisiae* AIMING THE INVERTASE PRODUCTION

**ABSTRACT:** The technique and immobilization



has become an alternative for industrial processes. *Saccharomyces cerevisiae* synthesizes the enzyme invertase, used in the food industry for the production of invert sugar, which is the raw material that guarantees the proper texture to the final product. The present work aimed at the triage of four treatments for immobilization of *S. cerevisiae*, being *Luffa cylindrica*, a biosupport, aiming the production of invertase. In the first batch of treatment 2% sodium hydroxide solution was used and kept under stirring at 120 RPM for 24 hours. The second batch was autoclaved at 123 ° C at 1.3 kgf/cm<sup>2</sup>, and the third batch was applied to both treatments. The fourth lot was used to control it. The lots were inoculated with the yeast and fermented with sodium bicarbonate (0.15 mol / L) for the production of invertase. The quantification of microorganisms adhered to the support was performed by Neubauer chamber counting, the quantification of proteins was performed by the biuret technique and the measurement of the activity of crude extract containing invertase was measured by the DNS technique. The second and third batch presented similar results to the control with 0.95% adherence of cells to the bush. The first batch presented 2.15% cell adhesion and produced enzymes with activity of 0.6 mol.L<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>. Even with a much lower adhesion percentage (0.95%), the enzymes coming from the control treatment showed activity 0.12 mol.L<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>, showing that vegetable sponge is a good biosupport for immobilization of this yeast even without treatment.

**KEYWORDS:** *Saccharomyces cerevisiae*, vegetal bush, immobilization, fermentation

## INTRODUÇÃO

Os microrganismos como as leveduras são capazes de produzir diversos produtos de interesse industrial, dentre os quais destaca-se a enzima invertase, obtida através da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (VARGAS *et al*, apud CHEETHAM, 1991). A invertase, também conhecida por  $\beta$ -frutofuranosidase (E. C. 3.2.1.26), é enzima responsável pela hidrólise da sacarose em glicose e frutose – também chamados de açúcar invertido, utilizado pelas indústrias alimentícias como adoçante (NOVAKI, 2009). O açúcar invertido possui vantagens por ter um poder de adoçante 20% maior que da sacarose pura, evitar processos dispendiosos de diluição e ser de fácil armazenamento e transporte (GRATÃO *et al*, 2004).

No cenário atual da pesquisa, sabemos que microrganismos, principalmente os fungos, possuem alta plasticidade, sendo capazes de variar sua morfologia ao longo dos ciclos de vida, influenciando diretamente na obtenção de um produto de interesse industrial (COVIZZI *et al*, 2007). Uma forma de minimizar essas alterações é imobilizando o microrganismo de interesse à uma matriz sólida. Esse tipo de abordagem só pode ser feito com microrganismos que possuem metabolismo extracelular, evitando assim a necessidade de retirar o metabólito de interesse do interior da célula.. Além disso, célula imobilizada também pode ser utilizada como biocatalizadora, podendo ser explorada para pesquisa e aplicada em processos de escala industrial (COVIZZI

*et al*, 2007).

A utilização de matéria orgânica e renovável como bio suporte ou matriz sólida, tendo em vista a sustentabilidade, vêm sendo atrativa para vários setores da indústria por ser econômico, de fácil obtenção e auxiliar na preservação do meio ambiente. A bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) é um material abundante e acessível, dessa forma pode ser explorado como um bio suporte adequado para a imobilização de células microbianas (COELHO, 2007).

A imobilização de um microrganismo pode trazer algumas vantagens para a indústria, dentre elas podemos considerar: o maior rendimento na produção, pois como se aumenta a concentração de células utilizadas, conseqüentemente observamos aumento na concentração de metabólitos sintetizados (COVIZZI *et al*, 2007). Além disso, esta técnica oferece facilidade de manutenção dos fermentadores, por evitar a obstrução da tubulação; dispensa algumas etapas de produção como a extração, isolamento e purificação da molécula de interesse, otimizando o processo e por fim, oferece possibilidade de reaproveitamento do microrganismo, sendo esse último, um dos principais benefícios da imobilização microbiana. (COVIZZI *et al*, 2007).

O presente estudo objetivou verificar a produção de invertase por *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*). buscamos avaliar o melhor tratamento da *Luffa cylindrica* para imobilização das células, quantificar o número de células de imobilizadas após cada etapa do processo, determinar da concentração proteica após fermentação submersa e por fim, avaliar a atividade enzimática do extrato bruto contendo invertase.

## **METODOLOGIA**

### **Preparo do suporte**

O preparo do suporte foi realizado segundo a metodologia apresentada por Coelho (2007) com algumas modificações. A bucha vegetal utilizada como suporte foi higienizada com água e seca em estufa a 60°C antes de ser padronizada em cubos com área de 2,25 cm<sup>2</sup> e esterilizada em autoclave. Foram realizados três tratamentos e um controle. No controle, os fragmentos de *Luffa cylindrica* foram submetidos apenas a autoclavação por 15 minutos a 121°C e 1 atm, e em seguida secos na estufa a 60°C. Para os tratamentos foram utilizadas temperatura (autoclave), no qual, submeteu-se o suporte a uma temperatura de 123°C e uma pressão de 1,3 kgf/cm<sup>2</sup> por 35 minutos em um equipamento de autoclave, ou solução alcalina (NaOH) a 2%, posta em contato com a bucha e deixada sob agitação por 24 horas a 120 rpm, após o tempo de contato as buchas foram lavadas e autoclavadas de 15 minutos a 121°C e 1 atm, por fim, um misto das duas técnicas (autoclave e NaOH).

## Imobilização Celular

Adicionou-se 50 mL de uma solução contendo 100 g/L de *Saccharomyces cerevisiae*<sup>[2]</sup> em erlenmeyers com as buchas devidamente tratadas. A mistura foi deixada sob agitação 120 rpm por 6 horas seguidas. As amostras foram lavadas com água destilada estéril por dez vezes.

## Produção de Invertase

Depois da imobilização foram colocados 50 mL da solução de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) a 0,15 mol/L<sup>[3]</sup> por 24 horas em estufa a 48,5 °C. O extrato obtido foi armazenado e as esponjas foram lavadas cinco vezes com água destilada estéril. Em seguida, adicionou-se mais 50 mL da mesma solução de bicarbonato de sódio para uma nova fermentação.

## Quantificação de Proteínas pela Técnica de Biureto

De cada lote acima citado foi escolhido uma amostra para que fosse realizada a quantificação de proteínas. Em um tubo de ensaio foi colocado 1,0 mL da amostra e 0,5 mL de água destilada, deixou no banho termostático por 15 minutos, a 37°C, em seguida adicionou 1,5 mL do reagente de Biureto<sup>[4]</sup> em cada tubo e leu no espectrofotômetro a 540 nm.

## Medida da Atividade do Extrato Bruto Contendo Invertase

A medida da atividade da invertase contida no extrato bruto foi realizada utilizando-se uma solução de sacarose (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>) a 0,5 mol/L<sup>[5]</sup> por 10 minutos de reação. A enzima foi desnaturada por 10 minutos em um banho termostático a 95 °C. A quantidade de glicose mais frutose gerada na reação foi mensurada pela técnica de DNS<sup>[6]</sup> segundo a metodologia SPIER (2005).

Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sacarose (0,5 M) (mL)	0	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,375	0,5	0,75	1,0
Tampão acetato (0,05 M) (mL)	2,25	2,2	2,15	2,1	2,05	2,0	1,875	1,75	1,5	1,25
Enzima (mL)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Tabela 1. Volume de sacarose, tampão acetato e enzima.

## Alimentação

Após a primeira fermentação as esponjas foram lavadas e distribuiu-se 100 mL de solução de sacarose<sup>[8]</sup> em cada erlenmeyer e após duas horas e meia as esponjas

foram lavadas e colocadas para a segunda fermentação.

### Quantificação de Microrganismos Aderidos no Suporte

Foram realizadas cinco quantificações, sendo elas: nas Solução de *Saccharomyces cerevisiae*, após a imobilização, depois da fermentação, após a alimentação e no fim a última fermentação. Para tanto, foi separado para análise de determinação da biomassa celular uma bucha de cada lote. O suporte com a levedura aderida foi retirado do erlenmeyer e colocado em tubos falcon devidamente identificados, com 20 mL de solução tween 80 (0,01%)<sup>[7]</sup> e posto sob agitação intensa em vórtex por 10 minutos. Em um eppendorf foi adicionado 1000  $\mu$ L a solução mais 1000  $\mu$ L de azul de metileno.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pré-tratamento realizado a base de calor tem como objetivo remover parcialmente a hidrólise de hemicelulose de forma que aumente os poros do material lignocelulósico (COELHO, 2007). O tratamento do suporte é muito importante para que a adsorção da célula no suporte seja ampliada, aumentando assim a concentração de células imobilizadas. A aplicação de substâncias alcalinas, como o hidróxido de sódio (NaOH) 2% (p/v) removem parte da hemicelulose e da lignina da superfície da bucha, causando uma modificação da estrutura cristalina da celulose, levando ao inchamento das fibras, promovendo o aumento da adesão de células (COELHO, 2007).

Para validar a eficácia dos diferentes tipos de tratamentos aplicados neste estudo, foi realizado a Técnica de Biureto após fermentação para confirmar a presença de proteínas nas amostras. O biureto passou pelas devidas etapas de padronização para ser utilizado, após isso foi plotado um gráfico com uma curva padrão do biureto, obtendo-se um  $R^2$  próximo de 0,994 atestando assim a confiabilidade dos resultados obtidos na Tabela 2 para concentração de proteínas em cada lote.

Replicatas	Controle (mol/L. min)	NaOH (mol/L. min)	Autoclave (mol/L. min)	Misto (mol/L. min)
1	0,135	0,206	0,225	0,180
2	0,199	0,212	0,110	0,301
3	0,250	0,199	0,123	0,269
4	0,257	0,333	0,123	0,250
5	0,161	0,333	0,078	0,218
6	0,167	0,384	0,116	0,161
7	0,084	0,238	0,123	0,238
8	0,097	0,199	0,110	0,193
9	0,110	0,193	0,123	0,250
<b>Média</b>	0,162 $\pm$ 0,063 <sup>ac</sup>	0,255 $\pm$ 0,074 <sup>b</sup>	0,126 $\pm$ 0,040 <sup>a</sup>	0,229 $\pm$ 0,045 <sup>bc</sup>

Tabela 2. Concentração de proteína para cada tratamento, considerando a técnica de biureto.

a, b, c – Amostras com letras iguais não diferem entre si a um nível de 5 % de significância ( $P < 0,05$ ).

Nos resultados obtidos, a amostra tratada a partir de vapor pela autoclave apresentou resultados iguais ao controle, sendo este considerado um tratamento inadequado. Desta forma, há evidências que a alta temperatura deste tratamento não tenha interferido na formação de poros da bucha impedindo assim que a levedura se aderisse ao suporte de maneira adequada. Além disto, a temperatura elevada por um longo período de tempo pode influenciar a bucha a liberar compostos indesejáveis, compostos estes que pode inibir a atividade da levedura e impedindo que a mesma produza proteínas de maneira eficiente (COELHO, 2007).

Como esperado, o lote tratado com NaOH exibiu resultados satisfatórios visto que a substância modifica a estrutura da bucha vegetal causando o inchamento das fibras e abertura de poros permitindo que a levedura se aderisse com maior facilidade. O lote misto, tratado na autoclave e NaOH apresentou resultados semelhantes aos obtidos pelas amostras tratadas apenas com NaOH. Pode-se deduzir que o tratamento de forma mista não foi eficiente, portanto a utilização da autoclave como parte da forma de tratamento se mostrou dispensável.

### Atividade enzimática

A atividade enzimática foi medida através da técnica de DNS. Essa técnica também passou por padronização e obtenção de uma curva padrão atestando a confiabilidade dos dados obtidos (PETKOWICZ, 2007). A presença de proteína foi detectada pelo teste de biureto apenas após a primeira fermentação, portanto, a concentração da enzima invertase foi mensurada apenas após a primeira fermentação,. A média dos resultados obtidos encontram-se na Tabela 3.

Autoclave (mol/L.min)	Controle (mol/L.min)	NaOH (mol/L.min)	Misto (mol/L.min)
<b>0,00225</b>	0,00518	0,00277	0,00222
<b>0,00246</b>	0,00342	0,00259	0,00311
<b>0,00293</b>	0,00447	0,00256	0,00339
<b>0,00536</b>	0,00518	0,00290	0,00348
<b>0,00444</b>	0,00407	0,00333	0,00509
<b>0,00543</b>	0,00530	0,00524	0,00532
<b>0,00552</b>	0,00506	0,00333	0,00552
<b>0,00987</b>	0,00601	0,00481	0,00746
<b>0,00972</b>	0,00721	0,00703	0,0102

Tabela 3. Média da velocidade enzimática (mol/L.min<sup>-1</sup>) para cada lote.

A partir das absorbâncias obtidas determinamos o comportamento enzimático plotando gráficos da concentração celular pela velocidade da reação, utilizando o modelo de análise de Michaelis-Menten. Os gráficos abaixo são portanto complementares a Tabela 3.

O tanto no lote controle (Gráfico 1a) quanto no lote de tratamento com solução alcalina (Gráfico 1b) não foi possível evidenciar características essenciais na atividade enzimática como a constância de uma velocidade máxima, portanto é possível que a concentração proteica encontrada não seja de origem enzimática. Como o suporte do lote controle não passou por nenhum tipo de tratamento, era de se esperar que não houvesse grande aderência das células fúngicas ao suporte e por consequência a produção enzimática fosse baixa ou quase nula, como é o caso. Porém como no caso do tratamento com NaOH observou-se que este era um dos melhores tratamentos para aderência de células. Podemos deduzir que as proteínas que lá estão podem não ser de origem enzimática ou que são de origem enzimática, mas se encontram em estado desnaturado, sugerindo que tenha ficado resíduo da solução alcalina e que a técnica necessita de aprimoramento.

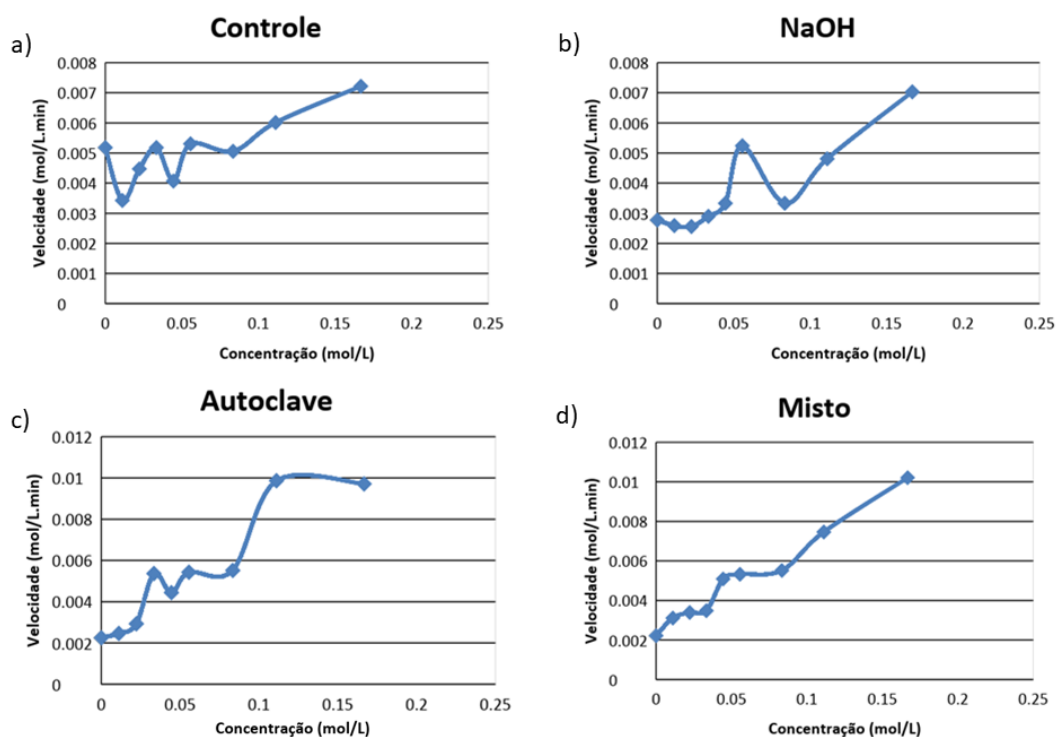


Gráfico 1. Atividade enzimática do: a) lote sem tratamento (controle). b) lote tratado com NaOH 2% (solução alcalina). c) lote sem autoclave (alta temperatura por tempo prolongado). d) lote sem autoclave (alta temperatura por tempo prolongado e solução alcalina).

O tratamento com calor prolongado (Gráfico 1c) observa-se semelhanças ao gráfico de Michaelis-Menten, já que apresenta um aumento gradual da atividade enzimática seguido de uma estabilização, caracterizando a Velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ). Apesar de na técnica do biureto os resultados foram insatisfatórios, comprovou-se com a técnica de DNS que o pouco de proteína que tinha era uma enzima ativa. Contudo quando a técnica de calor foi acrescida de solução básica (Gráfico 1d) percebemos novamente uma falta de singularidade com gráfico tipo de velocidade de reação. Existe um aumento gradual da velocidade pela concentração, porém não se



atinge uma velocidade máxima assim como quando se tratado o suporte apenas com hidróxido de sódio. Logo podemos entender que houve resquício de NaOH no suporte gerando uma alteração do pH da solução, acarretando na inativação das enzimas gradativamente.

### Aprimoramento da técnica utilizando a solução alcalina

Considerando os resultados obtidos percebemos que o tratamento que obteve maior produção proteica foi utilizando solução básica, contudo o mesmo tratamento não apresentou atividade enzimática. A partir dessa informação optou-se por repetir esse lote com algumas alterações a fim de potencializar os resultados, desta forma, acrescentamos as seguintes etapas: alimentação das leveduras entre as fermentações e contagem do número de células aderidas à esponja em várias etapas do processo.

Após a primeira e a segunda fermentação foram mensuradas a quantidade de proteína do no meio pela técnica de biureto. Os resultados podem ser observados na Tabela 4.

Replicatas	1ª fermentação		2ª fermentação	
	NaOH	Controle	NaOH	Controle
1	0,218	0,231	0,129	0,123
2	0,142	0,199	0,148	0,091
3	0,244	0,174	0,123	0,148
4	0,199	0,225	0,104	0,129
5	0,244	0,206	0,180	0,129
6	0,174	0,148	0,135	0,084
<b>Média</b>	<b>0,205±0,040<sup>a</sup></b>	<b>0,197±0,031<sup>a</sup></b>	<b>0,137±0,026<sup>a</sup></b>	<b>0,117±0,025<sup>a</sup></b>

Tabela 4. Quantificação proteica com biureto após a primeira e segunda fermentação.

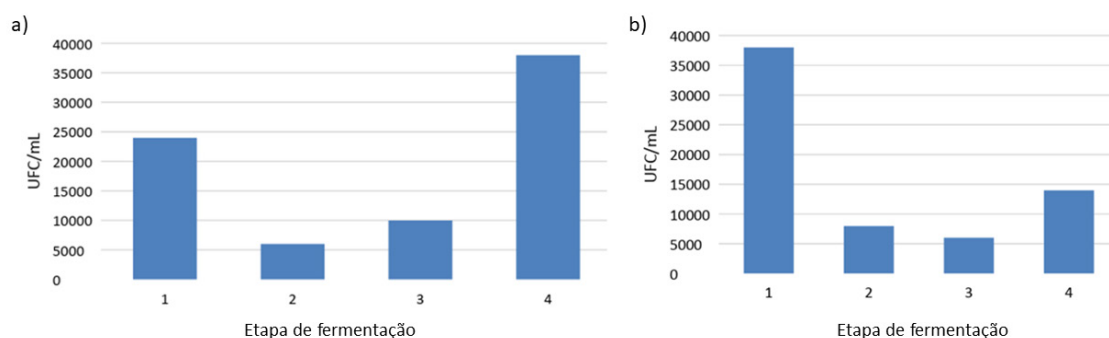
<sup>a</sup> – Amostras com letras iguais não diferem entre si a um nível de 5 % de significância ( $P < 0,05$ )

Nota-se que tanto no controle quanto no suporte tratado os resultados não se diferenciam entre si a um nível de 5% de significância. Behera, Mohanty e Ray (2011) realizaram a produção de etanol com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em bucha vegetal e, para isto, não tratou previamente o suporte, e mesmo obteve-se resultados positivos. Marques, Buzato e Celligoi (2006) produziram invertase com *Saccharomyces cerevisiae* e mesmo sem tratamento algum no suporte (*Luffa cylindrica*) conseguiram bons resultados. Desta forma, o resultado obtido no presente trabalho não se mostra diferente de respostas encontradas por outros autores.

### Contagem celular

A concentração obtida por contagem em câmara de Neubauer apresentou para solução de NaOH uma quantidade de  $1.7 \times 10^6$  UFC/mL. O controle exibiu uma contagem de  $2.5 \times 10^6$  UFC/mL. Baseado nestes resultados foi descoberto a quantidade

de células aderidas em cada lote, expressos no Gráfico 2.



**Gráfico 2.** a) Concentração *Saccharomyces cerevisiae* por UFC/mL no lote controle. b) Concentração *Saccharomyces cerevisiae* por UFC/mL no lote NaOH nas seguintes etapas: (1) número de células aderidas ao suporte (UFC/mL) após da imobilização; (2) Número de células aderidas ao suporte após a primeira fermentação; (3) Número de células aderidas ao suporte depois da alimentação; (4) Número de células aderidas ao suporte após a última fermentação.

Ao se comparar o Gráfico 2a (controle) com o Gráfico 2b (tratado) percebemos que o número de células aderidas à bucha tratada com NaOH foi consideravelmente maior que a quantidade de células aderidas ao Controle, sendo de 38.000 UFC/mL ou 2,15 % de células da solução de *Saccharomyces cerevisiae* e 24.000 UFC/mL ou 0,95 %, respectivamente. Dessa forma, podemos considerar que o tratamento com hidróxido de sódio conseguiu abrir as fibras do suporte e permitir que a células se aderisse.

Nas etapas 2 e 3 observa-se um decaimento na quantidade de células. O tempo de fermentação, de 20 horas, pode ter sido o causador da morte celular, visto que o micro-organismo produzia e não era alimentado. Após a última fermentação, com o lote alimentado, a quantidade de células no lote NaOH foi inferior ao Controle. Este fato pode ser em decorrência de que o NaOH, por ser uma base forte, tenha interferido no metabolismo da levedura impedindo sua multiplicação. Além disto, o tratamento com base forte pode ter liberado substâncias nocivas provenientes do próprio suporte. Desta forma o controle exibiu melhores resultados, já que o número de células após a última fermentação foi maior, podendo assim ser mais eficiente se utilizada para uma nova fermentação e produzir uma maior quantidade do produto desejado.

### Atividade enzimática

A atividade enzimática foi mensurada após a primeira e a segunda fermentação. Na primeira fermentação, como podemos observar no gráfico 3, tanto o lote controle quanto o lote de tratamento com NaOH apresentaram atividade enzimática similares, sendo que a maior velocidade de catálise obtida em ambos os tratamentos se encontram em torno de 0,005 mol/L.min. Demonstrando assim que o lote Controle foi tão efetivo quanto NaOH.

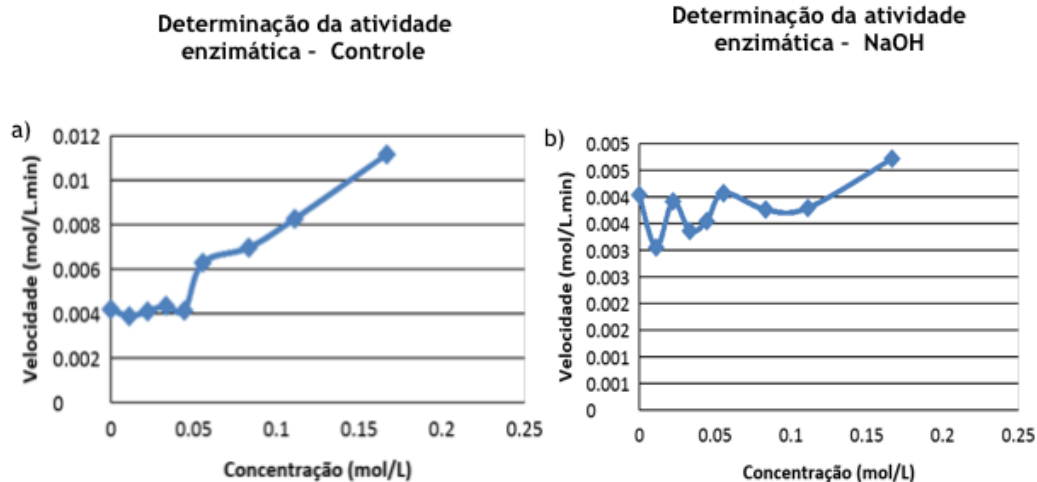


Gráfico 3. Atividade enzimática após a primeira fermentação. (a) Controle; (b) tratamento com NaOH.

Após a alimentação, pode-se notar, no gráfico 4, que a maior velocidade obtida com a enzima proveniente do lote controle foi o dobro da maior velocidade obtida com a enzima do tratamento com NaOH. Levando em consideração o teor de proteína obtido pelo método de biureto, que demonstrou a equivalência de ambos os métodos de imobilização na quantidade de proteína final, podemos concluir que é possível que as proteínas obtidas no tratamento com NaOH não sejam de origem enzimática ou estejam inativas. Desta forma, as células imobilizadas no controle produziram as proteínas enzimáticas de interesse deste trabalho.

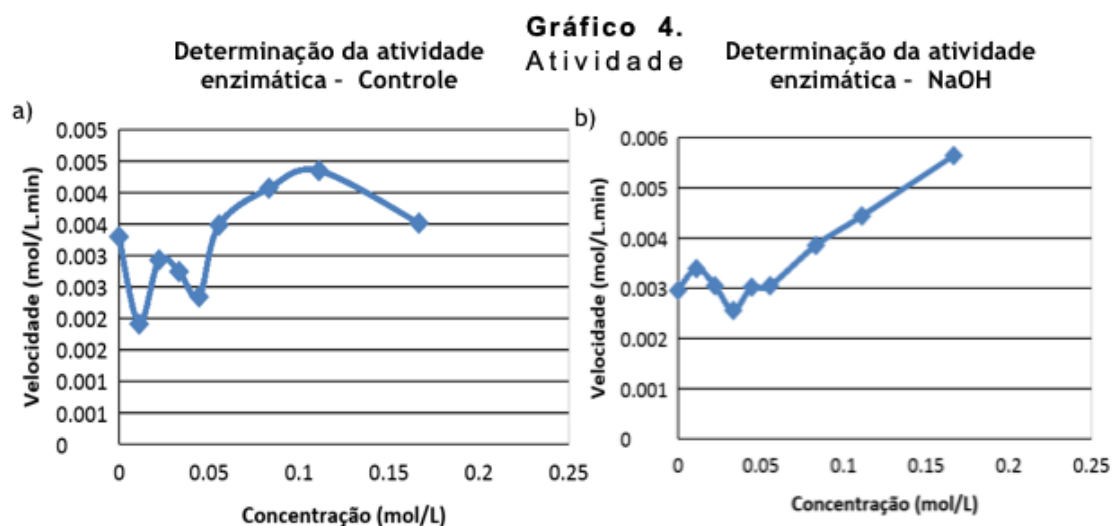


Gráfico 4. Atividade enzimática após a primeira fermentação. (a) Controle; (b) tratamento com NaOH.

## CONCLUSÃO

Após a realização de três tipos de tratamentos diferentes em bucha vegetal constatou-se que o lote tratado com NaOH ofereceu melhores condições para que

as células se aderissem ao suporte. Contudo, mesmo apresentando quantidade de células aderidas mais elevado se comparado aos demais tratamentos, foi o controle, um lote com número inferior de células imobilizadas que obteve melhor resultado na produção de proteínas com atividade catalítica na hidrólise de sacarose. O resultado apresentado por ambos os lotes se mostraram similares, portanto consideramos que o melhor tratamento para imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em bucha vegetal foi o controle. Este fato é animador uma vez que a aplicação do lote não tratado propiciará a redução de gastos com preparo do suporte.

Os resultados apresentados pelo presente trabalho demonstraram que foi possível a obtenção de invertase através de leveduras imobilizadas em escala laboratorial, contudo, a quantidade produzida não é aceitável para aplicação do processo em alta escala, sendo necessário a otimização das etapas de fermentação em trabalhos futuros para aplicação da técnica em processos industriais

## REFERENCIAS

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. Capítulo 1 – Introdução. **TECNOLOGIA ENZIMÁTICA**. 1ed. Rio de Janeiro: Epub, 284f, p. 8 – 9.

COELHO, T. C.; **AValiação de condições de imobilização de células de *Candida guilliermondii* FTI 20037 em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) visando a produção de xilitol**. 2007. 90p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2007.

COVIZZI, L. G.; GIESE, E. C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, R.; **IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS MICROBIANAS E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS**. 2007. 143-160p – Ciência Exatas e Tecnológicas, Londrina – Paraná.

GRATÃO, A. C. A.; BERTO, M. I.; JÚNIOR, V. S. **REOLOGIA DO AÇÚCAR LÍQUIDO INVERTIDO: INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA VISCOSIDADE**. 2004, 5f. Campinas – São Paulo.

HASAN, S. D. M.; NOVAKI, L.; KADOWAKI, M. K.; ANDRADE, D. **PRODUÇÃO DE INVERTASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO A PARTIR DE FARELO DE SOJA**. 2010. 9f. Processos Químicos e Bioquímicos. Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. Toledo – Paraná.

MAGNANI, M.; HERNAN, R. J. B-GLUCANA DE *Saccharomyces cerevisiae*: **CONSTITUIÇÃO, BIOATIVIDADE E OBTENÇÃO**. 2008. 20f. Doutorado em Ciências de Alimentos. Universidade Estadual de Londrina – UEL. Londrina – Paraná.

MEDRADO, L. C.L.; **ADSORÇÃO DE ÍONS CROMO (VI) PROVENIENTE DE EFLUENTES DE CURTUMES EM BUCHA VEGETAL (*LUFFA CYLINDRICA*) MODIFICADA COM ÁCIDO CÍTRICO**. 2011. 36p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel, Química Industrial) – Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **LEHNINGER PRINCÍPIOS DA BIOQUÍMICA**. 4ed. Sarvier, 2006, 1202f.

NOVAKI, L. **PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA INVERTASE OBTIDA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DE SOJA COM *Aspergillus casingii***. 2009, 70f. Processos Químicos e Bioquímicos. Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. Toledo – Paraná.

OGBONNA, J. C.; LIU, Y. C.; LIU, Y. K.; TANAKA, H. Loofa (*Luffa cylindrica*) Sponge as a Carrier for microbial cell immobilization. **JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING**, v.78, p. 434-442, 1994.

PASTORE, G. M; BICAS, J. B; MARÓSTICA JUNIOR, M. R. **BIOTECNOLOGIA DE ALIMENTOS**. 1ed. São Paulo: Atheneu, 2013, 520f, v. 12.

SANTOS, A. M.; **FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA COM LEVEDURA IMOBILIZADA EM COLMOS DE BAMBU E EM FIBRA DE COCO**. 2008. 82p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas. Maceió – Alagoas.

VARGAS, L. H. M.; CAMPOS, V. E.; CELLIGOI, M. A. P. C. AVALIAÇÃO DO TEMPO DE SONICAÇÃO NA LIBERAÇÃO DE INVERTASE POR *Saccharomyces cerevisiae*. 7f. Universidade Estadual de Londrina – UEL. Londrina – Paraná.

VERBELEN, P.J., DE SCHUTTER, D.P., DELVAUX, F., et al., 2006, **IMMOBILIZED YEAST CELL SYSTEMS FOR CONTINUOUS FERMENTATION APPLICATIONS**; Springer Science+Business Media B.V.

VIANA, T. M. L. **CARACTERIZAÇÃO BIOENERGÉTICA DE *Saccharomyces cerevisiae* EM FERMENTAÇÃO VINÁRIA**. 2009. 125f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar) – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

VICHIATO, M. R. M.; VICHIATO, M.; CASTRO, D. M.; DUTRA, L. F.; PASQUAL, M.; ARAÚJO, T. S.; **BUCHA VEGETAL E FERTILIZAÇÃO ORGANO-MINERAL NO CULTIVO DE *Dendrobium nobile* lindl.** 2008, Uruguaiana, v. 15, n.1, p. 34-42.

## AÇÃO FIBRINOLÍTICA DE PROTEASES PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE AMBIENTES AMAZÔNICOS

### **Thayana Cruz de Souza**

Instituto Leônidas e Maria Deane-ILMD/Fiocruz,  
Manaus - AM

### **Anni Kelle Serrão de Lima**

Instituto Leônidas e Maria Deane-ILMD/Fiocruz,  
Manaus - AM

### **Michele Silva de Jesus**

Instituto Leônidas e Maria Deane-ILMD/Fiocruz,  
Manaus - AM

### **Raimundo Felipe da Cruz Filho**

Universidade Federal do Amazonas (UFAM),  
Manaus – AM

### **Wim Maurits Sylvain Degrave**

Instituto Oswaldo Cruz (IOC)/Fiocruz, Rio de  
Janeiro - RJ

### **Leila de Mendonça Lima**

Instituto Oswaldo Cruz (IOC)/Fiocruz, Rio de  
Janeiro - RJ

### **Ormezinda Celeste Cristo Fernandes**

Instituto Leônidas e Maria Deane-ILMD/Fiocruz,  
Manaus - AM

foi isolar bactérias produtoras de proteases com ação fibrinolítica. A atividade proteolítica foi investigada em Agar leite. Em seguida, foi feita a fermentação submersa para obtenção do extrato bruto, a partir disso, realizou-se a quantificação da atividade proteolítica e avaliação quanto ao potencial fibrinolítico dos extratos em placa de fibrina. Das 150 amostras analisadas, 58% das culturas foram positivas para protease e 18% apresentaram ação fibrinolítica, destacando as espécies do gênero *Pseudomonas aeruginosa* CBAM 529 e CBAM 526 com 345 U/mL e 279 U/mL de atividade proteolítica, respectivamente. Esses resultados sugerem que as bactérias isoladas de ambientes amazônicos são microorganismos promissores para produção de proteases fibrinolíticas que podem ser alternativas para aplicação farmacêutica.

**PALAVRAS-CHAVE:** proteases, fermentação, fibrina, *Pseudomonas*

### **INTRODUÇÃO**

A trombose é considerada uma das principais causas de doenças cardiovasculares na vida moderna (Silva et al. 2013; Ashis & Sudhir, 2011), pois pode levar a infarto cerebral e do miocárdio, devido à coágulos de sangue não lisados (Abidi et al. 2014)

Um certo número de proteases que pode

**RESUMO:** A trombose é considerada uma das principais causas de doenças cardiovasculares na vida moderna, pois pode levar a infarto cerebral e do miocárdio, devido à coágulos de sangue não lisados. Devido a isso, as proteases que podem interferir na coagulação do sangue têm sido investigadas a partir de várias fontes microbianas. Portanto, o objetivo desse trabalho



interferir na coagulação do sangue tem sido purificada e caracterizada a partir de várias fontes, incluindo micro-organismos. Algumas destas proteases são enzimas fibrinolíticas capazes de digerir a fibrina (Sumi et al. 1995). Atualmente os agentes fibrinolíticos disponíveis para uso clínico são principalmente ativadores de plasminogênio, tais como o ativador de plasminogênio tissular, uroquinase e a estreptoquinase. Apesar da sua utilização generalizada, estes agentes apresentam baixa especificidade para fibrina, são muito caros e causam efeitos indesejados.

Conseqüentemente, a busca por enzimas fibrinolíticas para utilização na terapia contra trombose é um exercício contínuo, sendo que as proteases de origem microbiana são preferidas em comparação as que são obtidas a partir de fontes vegetais e animais, uma vez que aquelas possuem quase todas as características desejadas para as suas aplicações biotecnológicas, tais como baixo tempo de produção, facilidade de cultivo e de manipulação genética (Abidi et al. 2014).

Neste sentido, esse estudo teve como objetivo isolar, identificar e incorporar na Coleção de Bactérias da Amazônia (CBAM) culturas de bactérias produtoras de proteases, e investiga-las quanto à ação fibrinolítica.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Microrganismos e Investigação da Produção de Proteases**

Para este estudo foram utilizadas 150 culturas de bactérias isoladas de solo e água. As amostras produtoras de proteases foram identificadas com o Kit de identificação BBL Cristal e incorporadas na Coleção de Bactérias da Amazônia (CBAM/FIOCRUZ-Brasil).

Para obtenção do inóculo, as culturas foram subcultivadas em Agar Nutriente em placas de Petri ( $\varnothing=90\text{mm}\times 15\text{mm}$ ). Os cultivos foram mantidos a 37 °C por 24 horas (cultura estoque). A partir desta cultura, foi feito um inóculo central de cada amostra em Ágar Leite (Teixeira et al. 2011), para a investigação da produção de proteases. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C. A formação de halos translúcidos ao redor da colônia indicou atividade positiva para enzima.

#### *Preparo do inóculo e obtenção do extrato enzimático*

A fermentação submersa foi realizada transferindo-se 1 mL da suspensão celular similar a escala de MC Farland 0,5 em frascos de Erlenmeyers (50 mL) contendo 30 mL da solução de Manachini (1987) suplementado com gelatina a 0,5%. A fermentação submersa foi conduzida em agitador orbital durante 24 h/150 rpm/37 °C. O extrato foi separado da biomassa por filtração a vácuo. No extrato bruto recuperado foi

determinada a atividade proteolítica.

### Quantificação da atividade proteolítica

A quantificação da atividade proteolítica foi feita de acordo com Fleuri & Sato (2008) utilizando caseína como substrato (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) em tampão fostato 0,15M. Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir alteração de 0,01 na absorbância a 280 nm por minuto.

### Avaliação da atividade fibrinolítica

Os extratos brutos com ação proteolítica foram submetidos ao método de placa de fibrina de acordo com o método descrito por Astrup e Mullertz (1952), com pequenas modificações. A placa de fibrina (9 cm de diâmetro contendo 3 mm de espessura de gel de fibrina) foi preparada vertendo-se a mistura de 10 mL de fibrinogênio [0,5% (p/v)] e gel de agarose [1% (p/v)] com 0,1 mL de uma suspensão de trombina (100 unidades NIH/mL). Em seguida, foram confeccionados furos de 0,5 mm de diâmetro para aplicação de 20  $\mu$ L do extrato enzimático fibrinolítico bruto, e posteriormente as placas foram incubadas a 37 °C durante 18 horas e o diâmetro do halo translúcido foi medido .

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram analisadas 150 culturas de bactérias isoladas de solo e água da região amazônica, das quais 58% foram produtoras de protease. Pode-se destacar as culturas de *Pseudomonas aeruginosa* CBAM 529 e CBAM 526 com 345 U/mL e 279 U/mL de atividade proteolítica, respectivamente.

Quanto à atividade fibrinolítica, 18% das culturas apresentaram positividade no teste em placa de fibrina com variação de 7 a 27 mm no diâmetro dos halos. Pode-se destacar as amostras CBAM 516 *P. aeruginosa* (27 mm), CBAM 529 *P. aeruginosa* (27 mm), CBAM 368 *Burkholderia cepacia* (26 mm), CBAM 519 *Serratia marcescens* (25 mm) CBAM 546 *Bacillus cereus* (25 mm).

Todas as culturas que apresentaram ação proteolítica foram identificadas e incorporadas na Coleção de Bactérias da Amazônia (CBAM). Sendo mais prevalente os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* com 45% e 32% de amostras isoladas e produtoras de enzima, respectivamente.

De acordo com Raju & Divakar (2014) o gênero *Bacillus* é um dos mais importantes entre os microrganismos que têm sido encontrados para produzir as enzimas fibrinolíticas. Ao longo do tempo, foram sendo descobertas enzimas fibrinolíticas de origem bacteriana, tais como a Nattokinase (NK) a partir de *B. natto* (Sumi et al. 1987) e Subtilisina DFE e substilisin DJ- 4 a partir de *B. amyloliquefacien* (Pegui et al.

2002). Outro estudo indica que a nattokinase também pode ser purificada a partir do sobrenadante da cultura de estirpe TKU015 de *Pseudomonas* sp. isolada a partir do solo e que apresenta elevada atividade sobre a fibrina (Wang et al. 2009).

Esses resultados sugerem que as bactérias isoladas na Amazônia e depositadas na CBAM são micro-organismos promissores para produção de enzimas fibrinolíticas que podem ser alternativas para aplicação farmacêutica no tratamento contra trombose.

## CONCLUSÕES

Esse trabalho confirma o enorme potencial biotecnológico da biodiversidade brasileira, enfatizando as culturas bacterianas isoladas em ambientes amazônicos. Vale ressaltar que essas culturas capazes de produzir proteases com ação fibrinolítica e que podem ser usadas para o desenvolvimento de agentes terapêuticos estão mantidas na Coleção de Bactérias da Amazônia (CBAM), portanto, as informações contidas nesta coleção são recursos-chave para que o país possa utilizá-las no estabelecimento de estratégias rápidas e eficientes para o desenvolvimento científico e tecnológico.

## REFERÊNCIAS

- ASTRUP T, MULLERTZ S. 1952. The fibrin plate method for estimating of fibrinolytic activity. Arch Biochem Biophys;40:346–51. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861\(52\)90121-5](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(52)90121-5).
- FLEURI LF, SATO HH. 2008. Study of different parameters in the production of Lytic enzymes. Ciencia e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 28 299-310 pp.
- MANACHINI PL, FORTINA MG, PARINI C. 1987. Purification and properties of an endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. Biotechnology Letters 9: 219-224.
- Holden RW 1990 Plasminogen activators: Pharmacology and therapy. Radiology 174 993–1001
- PENG Y AND ZHANG YZ. 2002. Isolation and characterization of fibrinolytic enzyme producing strain DC-4 from Chinese douche and primary analysis of the enzyme property. Chin High Technol Lett 2002; 12: 30-34.
- RAJU EVN, DIVAKAR G. 2014. An overview on microbial fibrinolytic proteases. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. Vol. 5(3): 643-656.
- SILVA GMM, MARQUES DAV, PORTO TS, FILHO JLL, TEIXEIRA JAC, JÚNIOR AP, PORTO ALF. Extraction of fibrinolytic proteases from *Streptomyces* sp. DPUA1576 using PEG-phosphate aqueous two-phase systems. Fluid Phase Equilibria 339 p. 52– 57.
- SUMI H, NAKAJIMA N, YATAGAI C. 1995. A unique strong fibrinolytic enzyme (datsuwokinase) in skipjack “Shiokara”, a Japanese traditional fermented food. Comp. Biochem. Physiol. 112B 543–547
- SUMI H, HAMADA H, TSUSHIMA H, MIHARA H AND MURAKI H. 1987. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. Experientia; 43(10): 1110- 1111.
- TEIXEIRA MFS, SILVA, TA, PALHETA, RA, CARNEIRO, ALB, ATAYDE, HM. 2011. Fungos da Amazônia: Uma riqueza inexplorada (Aplicações biotecnológicas). Manaus. Edua.

WANG, SL, CHEN, HJ, LIANG, TW, LIN YD. 2009. A novel nattokinase produced by *Pseudomonas* sp. TKU015 using shrimp shells as substrate. *Process Biochemistry*. 44:2009) 70–76.

## ÁCIDO CÍTRICO: UM ENFOQUE MOLECULAR

### Letícia Fernanda Bossa

Departamento de Bioquímica e Biotecnologia,  
Universidade Estadual de Londrina  
Londrina-Paraná

### Daniele Sartori

Departamento de Bioquímica e Biotecnologia,  
Universidade Estadual de Londrina  
Londrina-Paraná

**RESUMO:** A molécula de ácido cítrico é um intermediário chave presente no ciclo do Ácido Cítrico. Por ser amplamente utilizado em vários segmentos industriais, é um dos ácidos orgânicos mais produzidos. Os fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente aqueles pertencentes à seção *Nigri*, apresentam uma grande importância industrial na produção de enzimas e ácidos orgânicos. A espécie *A. niger* é uma das mais estudadas com relação à produção e acúmulo de ácido cítrico, e também é a mais utilizada em processos biotecnológicos. Visto que, as primeiras reações do ciclo do Ácido Cítrico e suas respectivas enzimas, interferem diretamente na regulação da produção do ácido orgânico, há estudos analisando os genes e seus respectivos produtos, que estão envolvidos na produção do ácido cítrico. Sendo assim, é citado nesse trabalho as enzimas *citrate sintase*, *isocitrato desidrogenase* e *aconitase* e os aspectos moleculares envolvendo as

mesmas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ácido cítrico, *Aspergillus*, *citrate sintase*, *isocitrato desidrogenase*, *aconitase*

### CITRIC ACID: A MOLECULAR APPROACH

**ABSTRACT:** The citric acid molecule is a key intermediate present in the Citric Acid cycle. Because it is widely used in many industrial segments, it is one of the most produced acids. The fungi of the genus *Aspergillus*, especially those belonging to the *Nigri* section, are of great industrial importance in the production of enzymes and organic acids. The *A. niger* species is one of the most studied in relation to the production and accumulation of citric acid, and is also the most used in biotechnological processes. Since the first reactions of the Citric Acid cycle and their respective enzymes directly interfere in the regulation and production of the organic acid, there are studies analyzing the genes and their respective products, which are involved in the production of citric acid. Therefore, the enzymes *citrate synthase*, *isocitrate dehydrogenase* and *aconitase* and the molecular aspects involving them are mentioned in this work.

**KEYWORDS:** Citric acid, *Aspergillus*, *citrate synthase*, *isocitrate dehydrogenase*, *aconitase*

## PROPRIEDADES GERAIS DO ACÚMULO DE ÁCIDO CÍTRICO

A molécula de ácido cítrico é um intermediário chave presente no processo de respiração aeróbica nos organismos. A nomenclatura oficial, segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada, é ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico. Entre suas propriedades químicas, esse composto possui três grupamentos carboxílicos e apresenta uma estrutura cristalina na forma de sólido branco (MAX et al., 2010; COSTA, 2011; CIRIMINNA et al., 2017; TONG et al., 2019).

Pode ser encontrado naturalmente em frutas cítricas como lima, limão, abacaxi, entre outras. No entanto, desde meados do século XX, quando o pesquisador americano Currie verificou que a produção de ácido cítrico por linhagens de *Aspergillus niger* era favorecida em condições específicas, rapidamente foram surgindo diversas condições fermentativas para suprir o consumo de ácido pelo mercado (COSTA, 2011; FOOD INGREDIENTES BRASIL, 2014; ADITIVOS & INGREDIENTES, 2016; FRANÇA, 2016; CIRIMINNA et al., 2017; TONG et al., 2019).

Os mais variados segmentos como as indústrias de alimentos, bebidas, farmacêutica e cosméticos, utilizam o ácido cítrico na composição de seus produtos. Essa molécula pode ser empregada nas mais diversas formulações, por apresentar inúmeras propriedades, como agente acidulante, agente sequestrante, agente tamponante para controlar o pH, conservante, emulsionante, aromatizante e flavorizante (SOCCOL et al., 2006; COSTA, 2011; FOOD INGREDIENTES BRASIL, 2014; CIRIMINNA et al., 2017; TONG et al., 2019).

Há descrito na literatura três metodologias para a produção dessa molécula orgânica utilizando microrganismos: o processo Koji, a fermentação em superfície e a fermentação submersa, sendo que esta última é a mais utilizada na indústria. Fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*, se destacam pela alta produtividade e pelo acúmulo desse ácido em condições adequadas, porém a espécie amplamente utilizada industrialmente tem sido *Aspergillus niger* (SANTOS, 2005; MAX et al., 2010; FOOD INGREDIENTES BRASIL, 2014; ADITIVOS & INGREDIENTES, 2016; TONG et al., 2019).

## O GÊNERO ASPERGILLUS E O ACÚMULO DE ÁCIDO CÍTRICO

O gênero *Aspergillus* possui grande número de seus representantes empregados em fermentações de larga escala, para a produção de compostos bioativos, ácidos orgânicos e enzimas. Este gênero, segundo os trabalhos de Houbraken et al., (2014) e Hubka et al., (2014) é composto de 20 seções e quatro subgêneros sendo eles *Aspergillus*, *Circumdati*, *Fumigati* e *Nidulantes* (HOUBRAKEN et al., 2014; HUBKA et al., 2014; SAMSON, et al., 2014; PARK et al., 2017; FRISVAD et al., 2018; TONG et al., 2019).

Os fungos desse gênero que apresentam importância industrial, são em sua



maioria pertencentes à seção *Nigri* (PARK et al., 2017). Esta seção, que atualmente possui 27 espécies (HOUBRAKEN et al., 2014; SAMSON et al., 2014; FUNGARO et al., 2017), se destaca por contar com linhagens que receberam o *status* GRAS (Generally Regarded as Safe), ou seja, que são seguras para serem utilizadas em condições industriais, como por exemplo *Aspergillus niger* (VARGA et al., 2011; PARK et al., 2017; FRISVAD et al., 2018).

A espécie *A. niger* é uma das mais estudadas com relação à produção e acúmulo de ácido cítrico. Muitos trabalhos são encontrados na literatura apresentando as diferentes otimizações para a produção deste composto orgânico, pois alguns fatores interferem de forma direta nesse processo (FOSTER, 1949; ACOSTA, 1994; COSTA, 2000; RODRIGUES, 2006; PASTORE et al., 2011).

Entre esses fatores podem ser citados: fonte de carbono, nitrogênio e fosfato; pH; aeração; concentração de oligoelementos e o microrganismo produtor (FOSTER, 1949; GREWAL et al., 1995; RODRIGUES, 2006; PAPAGIANNI, 2007; MAX et al., 2010; PASTORE et al., 2011). É conhecido que a fonte de carbono e de fosfato mais adequada para a produção do ácido cítrico, são a sacarose e o fosfato de potássio monobásico, respectivamente (FOSTER, 1949; GREWAL et al., 1995; RODRIGUES, 2006; PASTORE et al., 2011).

Com o passar dos anos e visando a sustentabilidade, variadas fontes de carbonos provenientes de resíduos agroindustriais, foram sendo avaliadas para produção de ácido cítrico utilizando *A. niger*. Como exemplos podem ser citados: filtrado de farinha de milho (WANG et al., 2017), bagaço de cana-de-açúcar (FRANÇA, 2016); polpa cítrica (RODRIGUES, 2006); soro de leite (EL-HOLI and ALDELAIMY 2003), entre outros.

O fungo *A. niger* é amplamente descrito na literatura para a produção de ácido cítrico (RODRIGUES, 2006; AUTA et al., 2014; HU et al., 2014; HU et al., 2016). Porém, outros *Aspergillus* pertencente à seção *Nigri* são relatados por possuir a capacidade de acumular esse ácido orgânico em quantidades significativa, como: *Aspergillus carbonarius* (WEYDA et al., 2014; YANG et al., 2015; YANG et al., 2017), *Aspergillus kawachii*, *Aspergillus luchuensis* e *Aspergillus awamori*, este último reclassificado como *Aspergillus welwitschiae* (HONG et al., 2013; FUTAGAMI et al., 2015; TONG et al., 2019).

## ASPECTOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NO ACÚMULO DO ÁCIDO CÍTRICO

As primeiras reações do ciclo do ácido cítrico e suas respectivas enzimas, interferem diretamente na regulação e produção do ácido cítrico. Tendo em mente a sua importância, estudos realizaram a análise dos genes e seus produtos que estão envolvidos na produção deste ácido orgânico (PEL et al., 2007; ANDERSEN et al., 2011).

Quanto ao acúmulo de ácido cítrico, é conhecido haver principal participação das três primeiras reações do ciclo do ácido cítrico. Estas reações são catalisadas pelas enzimas *citrato sintase*, *isocitrato desidrogenase* e *aconitase* (PAPAGIANNI, 2007; AKRAM, 2014).

Segundo informações do banco de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI), para essas proteínas já foram depositadas sequências das mais variadas espécies fúngicas.

## ASPECTOS MOLECULARES DA CITRATO SINTASE

Para a formação do ácido cítrico, em sua forma de citrato, é necessário que a enzima citrato sintase realize a condensação do oxaloacetato com o acetil-CoA, na primeira reação do ciclo do ácido cítrico (AKRAM, 2014). Esta reação é considerada o primeiro ponto de regulação da via. Sua atividade é menor quando ocorre inibição por retroalimentação do seu produto, NADH e adenosina trifosfato (ATP). Em contrapartida, sua atividade é estimulada pela adenosina difosfato (ADP) (NELSON e COX, 2011; VOET e VOET, 2013; AKRAM, 2014).

Conforme descrito por Pel et al. (2007), a linhagem CBS 513.88 de *A. niger*, apresenta uma *citrato sintase* citosólica e três enzimas putativas na mitocôndria. Dentre as formas de *citrato sintases* descritas até o momento, a *citrato sintase* codificada pelo gene *citA*, tem sido melhor estudada. Em geral, a enzima *citrato sintase* codificada por *citA*, localizada na mitocôndria, possui três éxons e seis íntrons, e codifica uma proteína com 465 aminoácidos com um domínio conservado (RUIJTER et al., 2000; PEL et al. 2007; NCBI, 2019).

Ruijter et al. (2000), constataram que a enzima *citrato sintase* em *A. niger*, codificada pelo gene *citA*, apresenta massa molecular desnaturada da enzima de 48 kDa. Enquanto que, durante o procedimento de filtração em gel utilizado pelos pesquisadores, a massa molecular seria de aproximadamente 80 kDa, indicando que a enzima nativa teria o formato de um dímero (RUIJTER et al., 2000).

Outra informação relevante foi encontrada na porção C terminal da proteína codificada por *citA*, que contém uma sequência alvo peroxissomal (AKL) em duplicata. Essa mesma sequência alvo já foi verificada nos genes que codificam *citrato sintase* de *N. crassa* e *A. nidulans* (RUIJTER et al., 2000).

Murray e Hynes (2010), descreveram que *Aspergillus nidulans* possui um único gene *citA* que é capaz de codificar uma proteína com sequências de direcionamento mitocondriais e peroxissômicas. No entanto, estudos têm demonstrado que *A. nidulans* possui os genes que codificam tanto a *citrato sintase* como a *metilcitrato sintase*, genes *citA* e *mcsA*, respectivamente (PARK et al., 1997; BROCK et al., 2000; MURRAY and HYNES, 2010).

Com relação à enzima *metilcitrato sintase*, foi constatado que a mesma possui

sua localização na mitocôndria e que esta enzima possui tanto ação de *citrato sintase* como de *metilcitrato sintase*, que é importante para o metabolismo de propionil-CoA, em microrganismos como *A. nidulans* e *A. fumigatus* (MURRAY and HYNES, 2010).

No mesmo estudo foi averiguado que a deleção de *citA*, implica em menor crescimento de *A. nidulans* em meios contendo glicose. Em contrapartida, a enzima *metilcitrato sintase* pode ser regulada em situações de indução por fontes carbono, e a atividade desta última pode substituir a enzima *citrato sintase* deletada. Essa teoria dos autores é sustentada pela incapacidade de obter um mutante duplo para *citrato* e *metilcitrato sintase* (MURRAY and HYNES, 2010).

## ASPECTOS MOLECULARES DA ACONITASE

A enzima *aconitase* é responsável pela conversão do citrato no intermediário isocitrato, na segunda reação do ciclo do Ácido Cítrico (AKRAM, 2014). Possui em sua estrutura um centro ferro-enxofre no seu sítio ativo. A atividade enzimática pode ser regulada por íons como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ , sendo que o primeiro favorece a maior produção de ácido cítrico, enquanto que os outros dois íons diminuem esse rendimento (KUBICEK E RÖHR, 1985; ACOSTA, 1994).

Oberegger et al. (2002), verificaram que em cepas de *A. nidulans* a influência do íon ferro sobre o gene *acoA*, que codifica a enzima *aconitase* é dependente de ferro como cofator, e que a regulação da enzima foi reprimida com a depleção de ferro. Discutiu-se também, que a homeostase de ferro pode sofrer regulação transcricional dependente de fator SREA ou pela expressão de um gene putativo que codifica uma *metaloredutase* contendo grupo heme, denominado *freA* (OBeregger et al., 2002).

Já Fazius et al. (2012), descreveram em *A. fumigatus* a presença de dois genes que codificam aconitases distintas em seu genoma, denominadas de *AcoA* e *AcoB*. Após a purificação da proteína obteve-se que a *aconitase AcoA*, apresenta 787 aminoácidos com uma sequência de importação mitocondrial de 33 aminoácidos, sendo essencial para o crescimento do fungo (FAZIUS et al., 2012).

A *aconitase AcoB* já foi descrita em *A. fumigatus* e *A. nidulans*, contendo apenas um íntron na sequência de importação mitocondrial. Um homólogo de *AcoB* presente no genoma de *Penicillium chrysogenum* mostrou 86% de identidade com *AcoB* de *A. fumigatus*, e esta segunda *aconitase* está relacionada com a via do  $\alpha$ -aminoadipato (FAZIUS et al., 2012).

Além das duas aconitases citadas (*AcoA* e *AcoB*), uma terceira enzima *aconitase*, denominada de *AcoC* foi identificada no genoma de *A. fumigatus*, porém sem maiores informações até o momento. No entanto, em *A. niger* (CBS 513.88), é conhecido que a enzima *aconitase* possui sequência de 817 aminoácidos, com dois domínios conservados e oito éxons (FAZIUS et al., 2012; NCBI, 2019).

## ASPECTOS MOLECULARES DA ISOCITRATO DESIDROGENASE

A enzima *isocitrato desidrogenase* catalisa a terceira reação do ciclo do Ácido Cítrico onde ocorre a conversão de isocitrato a  $\alpha$ -cetoglutarato. A reação catalisada por essa enzima é considerada o segundo ponto de regulação do ciclo. Em sua estrutura catalítica possui o íon manganês ( $Mn^{+2}$ ) em seu sítio ativo, um dos íons que participam de sua regulação junto com o magnésio ( $Mg^{+2}$ ) (BOWES e MATTEY, 1979; MEIXNER-MONORI et al., 1986). Adicionalmente, a enzima pode ser inibida por ATP, enquanto que íons cálcio ( $Ca^{+2}$ ) juntamente com ADP estimulam sua atividade (NELSON e COX, 2011; VOET e VOET, 2013; AKRAM, 2014).

Segundo o estudo de Kirimura et al. (2002), as células eucarióticas possuem três enzimas *isocitrato desidrogenase* (ICDH), sendo que cada uma apresenta diferentes funções metabólicas com relação a especificidade do cofator e à sua localização celular (KIRIMURA et al., 2002).

Uma das ICDHs, a isoforma mitocondrial e específica para  $NAD^+$ , é uma enzima alostérica em formato de octâmero, com sua regulação realizada por NADH e nucleotídeos de adenina, tornando-a uma enzima reguladora chave do ciclo do Ácido Cítrico (KIRIMURA et al., 2002).

As outras duas isoformas de ICDHs são específicas para  $NADP^+$  e podem ser encontradas tanto no citosol, quanto na mitocôndria. São encontradas principalmente como homodímeros, sua regulação não é alostérica e sua regulação é dada principalmente em nível transcricional (KIRIMURA et al., 2002).

O gene que codifica a isocitrato desidrogenase (*icdA*) em *A. niger* CBS 513.88, o qual codifica uma das isoformas localizadas na mitocôndria, apresenta cinco éxons e 7 íntrons. O gene *icdA* codifica uma sequência de 385 aminoácidos, com um domínio conservado (NCBI, 2019).

## REFERÊNCIAS

ACOSTA, L. A. **Análise dos meios de cultura para a produção de ácido cítrico por linhagens de *Aspergillus niger***. Dissertação de mestrado - Universidade Estadual de Campinas (SP), Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1994. Disponível em: <http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/256588>. Acesso em: 14 nov. 2018.

ADITIVOS & INGREDIENTES. Ácido cítrico ou citrato de hidrogênio. Aditivos & Ingredientes, p. 30-35, 2016. Disponível em: [http://aditivosingredientes.com.br/upload\\_arquivos/201604/2016040746833001460591974.pdf](http://aditivosingredientes.com.br/upload_arquivos/201604/2016040746833001460591974.pdf). Acesso em: 13 nov. 2018.

AKRAM, M. **Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism**. Cell Biochemistry and Biophysics, vol. 68, nº 3, p. 475–478, 2014. doi:10.1007/s12013-013-9750-1

ANDERSEN, M. R., et al. **Comparative genomics of citric acid producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme producing CBS 513.88**. Genome Research, vol. 21, nº 6, p. 885–897, 2011. doi:10.1101/gr.112169.110.

AUTA, H. S.; ABIDOYE, K. T.; TAHIR, H.; IBRAHIM, A. D.; ARANSIOLA, S. A. **Citric acid production**

by *Aspergillus niger* cultivated on *Parkia biglobosa* fruit pulp. International scholarly research notices, 2014. doi:10.1155/2014/762021

BOWES, I.; MATTEY, M. **The effect of manganese and magnesium ions on mitochondrial NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase from *Aspergillus niger*.** FEMS Microbiology Letters, vol. 6, n° 4, p. 219-222, 1979. doi:10.1016/0378-1097(79)90064-8.

BROCK, M.; FISCHER, R.; LINDER, D.; BUCKEL, W. **Methylcitrate synthase from *Aspergillus nidulans*: implications for propionate as an antifungal agent.** Molecular Microbiology, vol. 35, n° 5, p. 961–973, 2000.

CIRIMINNA, R.; MENEGUZZO, F.; DELISI, R.; PAGLIARO, M. **Citric acid: Emerging applications of key biotechnology industrial product.** Chemistry Central Journal, vol. 11, n° 1, 2017. doi:10.1186/s13065-017-0251-y.

COSTA, F. A. A. **Estudo de otimização do meio de cultura para produção de ácido cítrico por *Candida lipolytica*.** Tese de doutorado – Universidade Estadual de Campinas (SP), 2000.

COSTA, L. M. A. S. **Caracterização de isolados de *Aspergillus niger* quanto à produção de ácido cítrico e à expressão de genes da citrato sintase.** Tese de doutorado – Universidade Federal de Lavras (MG), 2011.

EL-HOLI, M. A.; AL-DELAIFY, K. S. **Citric acid production from whey with sugars and additives by *Aspergillus niger*.** African Journal of Biotechnology, vol. 2, n° 10, p. 356–359, 2003. doi:10.5897/AJB2003.000-1073.

FAZIUS, F.; SHELEST, E.; GEBHARDT, P.; BROCK, M. **The fungal  $\alpha$ -aminoacid pathway for lysine biosynthesis requires two enzymes of the aconitase family for the isomerization of homocitrate to homoisocitrate.** Molecular Microbiology, vol. 86, n° 6, p. 1508–1530, 2012. doi:10.1111/mmi.12076.

FOOD INGREDIENTES BRASIL. **Aplicações do ácido cítrico na indústria de alimentos.** Food Ingredientes Brasil, n° 30, p. 96-103, 2014. Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materias/402.pdf>

FOSTER, J. W. **Chemical Activities of Fungi.** Academic Press, Inc., New York, p. 1-648, 1949.

FRANÇA, H. C. R. **Produção de ácido cítrico a partir do cultivo de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* em bagaço de cana-de-açúcar e fermentação etanólica do extrato fúngico.** Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de São Carlos, 2016.

FRISVAD, J. C.; MØLLER, L. L. H.; LARSEN, T. O.; KUMAR, R.; ARNAU, J. **Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*.** Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 102, n° 22, p. 9481–9515, 2018. doi:10.1007/s00253-018-9354-1.

FUNGARO, M. H. P.; FERRANTI, L. S.; MASSI, F. P.; SILVA, J. J.; SARTORI, D.; TANIWAKI, M. H.; FRISVAD, J. C.; IAMANAKA, B. T. ***Aspergillus labruscus* sp. nov., a new species of *Aspergillus* section *Nigri* discovered in Brazil.** Scientific Reports, vol. 7, n° 1, p. 1-9, 2017. doi:10.1038/s41598-017-06589-y.

FUTAGAMI, T.; MORI, K.; WADA, S.; IDA, H.; KAJIWARA, Y.; TAKASHITA, H.; TASHIRO, K.; YAMADA, O.; OMORI, T.; KUHARA, S.; GOTO, M. **Transcriptomic analysis of temperature responses of *Aspergillus kawachii* during Barley koji production.** Applied and environmental microbiology, vol. 81, n° 4, 1353-1363, 2015.

GREWAL, H. S.; KALRA, K. L. **Fungal production of citric acid.** Biotechnology Advances, vol. 13, n° 2, p. 209–234, 1995. doi:10.1016/0734-9750(95)00002-8.



HONG, S. B.; LEE, M.; KIM, D. H.; VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; PERRONE, G.; GOMI, K.; YAMADA, O.; MACHIDA, M.; HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A. ***Aspergillus luchuensis*, an industrially important black *Aspergillus* in east Asia**. PLoS ONE, vol. 8, n° 5, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063769>

HOUBRAKEN, J.; VRIES, R. P.; SAMSON, R. A. **Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species**. Advances in Applied Microbiology, vol. 86, p. 199–249, 2014. doi: 10.1016/B978-0-12-800262-9.00004-4.

HUBKA, V.; NOVÁKOVÁ, A.; KOLARÍK, A. et al. **Revision of *Aspergillus* section *Flavipedes*: seven new species and proposal of section *Jani* sect. nov.** Mycologia: In press, 2014.

HU, W.; CHEN, J. H.; WANG, S. Y.; LIU, J.; SONG, Y.; WU, Q. F.; LI, W. J. **Changes in the physiological properties and kinetics of citric acid accumulation via carbon ion irradiation mutagenesis of *Aspergillus niger***. Journal of Zhejiang University Science B, vol. 17, n° 4, p. 262–270, 2016. doi: 10.1631/jzus.B1500120

HU, W.; LIU, J.; CHEN, J. H.; WANG, S. Y.; LU, D.; WU, Q. H.; LI, W. J. **A mutation of *Aspergillus niger* for hyper-production of citric acid from corn meal hydrolysate in a bioreactor**. Journal of Zhejiang University Science B, vol. 15, n° 11, p. 1006-1010, 2014. doi: 10.1631/jzus.B1400132

KIRIMURA, K.; YODA, M.; KUMATANI, M.; ISHII, Y.; KINO, K.; USAMI, S. **Cloning and expression of *Aspergillus niger icdA* gene encoding mitochondrial NADP<sup>+</sup>-Specific isocitrate dehydrogenase**. Journal of Bioscience and Bioengineering, vol. 93, n° 2, p. 136–144, 2002. doi:10.1016/S1389-1723(02)80005-6.

KUBICEK, C. P. AND ROHR, M. **Aconitase and citric acid fermentation by *Aspergillus niger***. Applied and Environmental Microbiology, vol. 50, n° 5, p. 1336-1338, 1985.

MAX, B.; SALGADO, J. M.; RODRÍGUEZ, N.; CORTÉS, S.; CONVERTI, A.; DOMÍNGUEZ, J. M. **Biotechnological production of citric acid**. Brazilian Journal of Microbiology, vol. 41, n° 4, p. 862–875, 2010. doi:10.1590/S1517-83822010000400005.

MEIXNER-MONORI, B.; KUBICEK, C. P.; HARRER, W.; SCHREFERL, G.; ROHR, M. **NADP-specific isocitrate dehydrogenase from the citric acid accumulating fungus *Aspergillus niger***. Biochemical Journal, vol. 236, n° 2, p. 549–57, 1986. doi:10.1042/bj2360549.

MURRAY, S. L. AND HYNES, M. J. **Metabolic and developmental effects resulting from deletion of the *citA* gene encoding citrate synthase in *Aspergillus nidulans***. Eukaryotic Cell, vol. 9, n° 4, p. 656–666, 2010. doi:10.1128/EC.00373-09.

NCBI. **National Center for Biotechnology Information**. 2019. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> > Acesso em: 20 fev. 2019.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

OBeregger, H.; Schoeser, M.; ZADRA, I.; Schrettl, M.; Parson, W.; Haas, H. **Regulation of *freA*, *acoA*, *lysF*, and *cycA* expression by iron availability in *Aspergillus nidulans***. Applied and Environmental Microbiology, vol. 68, n° 11, p. 5769–72, 2002. doi: 10.1128/AEM.68.11.5769–5772.2002

PAPAGIANNI, M. **Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling**. Biotechnology Advances, vol. 25, n° 3, p. 244–63, 2007. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.01.002.

PARK, B. W.; HAN, K. H.; LEE, C. Y.; LEE, C. H.; MAENG, P. J. **Cloning and characterization of the**



***citA* gene encoding the mitochondrial citrate synthase of *Aspergillus nidulans*.** Molecules and Cells, vol. 7, nº 2, p. 290–295, 1997.

PARK, H. S.; JUN, S. C.; HAN, K. H.; HONG, S. B.; YU, J. H. **Chapter Three - Diversity, application, and synthetic biology of industrially important *Aspergillus* fungi.** Advances in Applied Microbiology, vol. 100, p. 161–202, 2017. doi:10.1016/bs.aambs.2017.03.001.

PASTORE, N. S.; HASAN, S. M.; ZEMPULSKI, D. A. **Produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*: Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio e de concentração de sacarose.** Engevista, vol. 13, nº 3, 2011. doi:10.22409/engevista.v13i3.306.

PEL, H. J., et al. **Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88.** Nature Biotechnology, vol. 25, nº 2, p. 221–31, 2007. doi:10.1038/nbt1282

RODRIGUES, C. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica.** Dissertação de mestrado - Universidade Federal do Paraná, p. 1-93, 2006.

RUIJTER, G. J. G.; PANNEMAN, H.; XU, D. B.; VISSER, J. **Properties of *Aspergillus niger* citrate synthase and effects of *citA* overexpression on citric acid production.** FEMS Microbiology Letters, vol. 184, nº 1, p. 35–40, 2000. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb08986.x>

SAMSON, R. A.; VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S. B.; HUBKA, V.; KLAASSEN, C. H.; PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; SUSCA, A.; TANNEY, J. B.; VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; SZIGETI, G.; YAGUCHI, T.; FRISVAD, J. C. **Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*.** Studies in Mycology, vol. 78, p. 141–173, 2014. doi:10.1016/j.simyco.2014.07.004.

SANTOS, R. S. **Obtenção de ácido cítrico por fermentação submersa a partir de hidrolisado hemicelulósico em biorreator.** Dissertação de mestrado – Faculdade de Engenharia Química de Lorena, p. 1-81, 2005.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; RODRIGUES, C.; PANDEY, A. **New perspectives for citric acid production and application.** Food Technology and Biotechnology, vol. 44, nº 2, p. 141–149, 2006.

TONG, Z.; ZHENG, X.; TONG, Y.; SHI, Y. C.; SUN, J. **Systems metabolic engineering for citric acid production by *Aspergillus niger* in the post-genomic era.** Microbial Cell Factories, vol. 18, 2019. doi:10.1186/s12934-019-1064-6.

VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; KOCSUBÉ, S.; BRANKOVICS, B.; TÓTH, B.; SZIGETI, G.; SAMSON, R. A. **New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*.** Studies in Mycology, v. 69, n. 1, p. 1-17, 2011.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica.** 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

WANG, B. LI, H.; ZHU, L.; TAN, F.; LI, Y.; ZHANG, L.; DING, Z.; SHI, G. **High-Efficient production of citric acid by *Aspergillus niger* from high concentration of substrate based on the staged-addition glucoamylase strategy.** Bioprocess and Biosystems Engineering, vol. 40, nº 6, p. 891–99, 2017. doi:10.1007/s00449-017-1753-7

WEYDA, I.; LÜBECK, M.; AHRING, B. K.; LÜBECK, P. S. **Point mutation of the xylose reductase (XR) gene reduces xylitol accumulation and increases citric acid production in *Aspergillus carbonarius*.** Journal of industrial microbiology & biotechnology, vol. 41, nº 4, p. 733-739, 2014. doi: 10.1007/s10295-014-1415-6

YANG, L.; CHRISTAKOU, E.; VANG, J.; LÜBECK, M.; LÜBECK, P. S. **Overexpression of a C<sub>4</sub>-dicarboxylate transporter is the key for rerouting citric acid to C<sub>4</sub>-dicarboxylic acid production**

in *Aspergillus carbonarius*. Microbial Cell Factories, vol 16, nº 1, p. 43, 2017. doi:10.1186/s12934-017-0660-6

YANG, L.; LÜBECK, M.; LÜBECK, P. S. **Effects of heterologous expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase and phosphoenolpyruvate carboxylase on organic acid production in *Aspergillus carbonarius***. Journal of industrial microbiology & biotechnology, vol. 42, nº 11, p. 1533-1545, 2015. doi 10.1007/s10295-015-1688-4

## ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DE MANGUEZAL E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

### **Gabriela Xavier Schneider**

Universidade Federal do Paraná, Departamento de Patologia Básica  
Curitiba – Paraná

### **Jean Carlos Ramos de Almeida**

Universidade Estadual do Paraná – Campus Paranaguá, Departamento de Ciências Biológicas  
Paranaguá – Paraná

### **Kassiely Zamarchi**

Universidade Federal do Paraná, Departamento de Patologia Básica  
Curitiba – Paraná

### **Débora Santos**

Universidade Estadual do Paraná – Campus Paranaguá, Departamento de Ciências Biológicas  
Paranaguá – Paraná

### **Danyelle Stringari**

Centro Universitário de Estudos e Pesquisas sobre Desastres  
Curitiba – Paraná

### **Renata Rodrigues Gomes**

Universidade Federal do Paraná, Departamento de Patologia Básica  
Curitiba – Paraná

**RESUMO:** O manguezal é definido como um ecossistema costeiro de transição entre os ambientes terrestre e marinho, sendo considerado um ecossistema-chave cuja preservação é essencial para o funcionamento

de ecossistemas adjacentes. É um ecossistema que apresenta condições abióticas típicas as quais podem vir a ocasionar condições de stress para a microbiota do sedimento de manguezal, como grandes variações de salinidade, pH, temperatura, nível da maré e disponibilidade de oxigênio (O<sub>2</sub>), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e matéria orgânica (nutrientes disponíveis para assimilação). Devido a abundância de carbono e outros nutrientes no solo, o manguezal abriga ampla diversidade de comunidades microbianas, visto que é ainda uma fonte inexplorada de actinobactérias cujas são capazes de produzir metabólitos secundários com a finalidade de inibir ou retardar o crescimento microbiano fúngico ou bacteriano, como por exemplo enzimas e/ou antimicrobianos. A ampla distribuição destas bactérias neste ecossistema confere ao mesmo o status de “hotspot” de actinobactérias com potencial biotecnológico, uma vez que há poucos estudos realizados no Brasil que estabeleçam a relação entre a microbiota existente neste sedimento e seu potencial biotecnológico. Sendo assim, a presente revisão procura evidenciar a importância das actinobactérias no sedimento de ecossistema de manguezal brasileiros e indicar possíveis aplicações.

**PALAVRAS-CHAVE:** Actinobactérias; Manguezal; Biotecnologia; Metabólitos; Enzimas.

**ABSTRACT:** The mangrove is a transitional coastal ecosystem between terrestrial and marine environments being considered a key-ecosystem whose preservation is essential for the adjacent ecosystems functioning. Mangrove ecosystem presents typical abiotic conditions that may lead to stress conditions such as large variations in salinity, pH, temperature, oxygen (O<sub>2</sub>), carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), organic matter and tide level. Because of the carbon and nutrients abundance in mangrove soil, this sediment is compounded by a wide microbial communities diversity. It is an unexplored source actinomycetes, which are capable to produce secondary metabolites to inhibiting or retarding fungal or bacterial microbial growth, for example enzymes and/or antimicrobials. The wide distribution of these bacteria in this ecosystem confers to mangrove the “hotspot” status of actinomycetes with biotechnological potential, since there are not studies in Brazil that establish the relationship between soil mangrove microbiota and biotechnological potential of them. Thus, the present review seeks to highlight the actinomycetes importance in sediments of Brazilian mangrove ecosystem and to indicate possible applications.

**KEYWORDS:** Actinomycetes; Mangrove; Biotechnology; Metabolites; Enzymes.

## 1 | INTRODUÇÃO

A costa brasileira apresenta uma das maiores extensões de manguezais do mundo, com cerca de 20 mil km<sup>2</sup> abrangendo desde o extremo norte do país, no Amapá, até o Sul no estado de Santa Catarina (CURY, 2002). Manguezal é definido como um ecossistema costeiro de transição entre os ambientes terrestre e marinho que toleram condições de alta salinidade, solo anaeróbico e altas temperaturas, sendo considerado um ecossistema-chave cuja preservação é essencial para o funcionamento de outros ecossistemas (SCHAEFFER-NOVELLI et al., 2000).

Por estarem em contato direto com fatores típicos do ecossistema de manguezal, os microrganismos que compõe esse sedimento estão adaptados à condições de stress, como por exemplo, hídrico e osmótico, entretanto podem ser sensíveis a perturbações antrópicas. O manguezal têm como principal função proteger ecossistemas adjacentes; estabelecer as linhas costeiras entre ecossistema terrestre e aquático; enriquecer as águas do local, uma vez que fornece uma grande quantidade de nutrientes na forma de detrito para os ambientes próximos. O sedimento deste ecossistema abriga uma microbiota bacteriana típica desempenhando papel essencial no controle de químicos presentes no solo. Além disso, a presença de bactérias redutoras de sulfato no sedimento de manguezal contribui para os padrões de vegetação e solo visto que são os principais decompositores de sedimentos anaeróbicos de manguezal (KATHIRESAN; BINGHAM, 2001).

O solo de manguezal é formado pela deposição de partículas de origem terrígena e marinha, orgânicas e inorgânicas (THATOI et al., 2013). Devido a abundância de

carbono e outros nutrientes nesse solo, o manguezal abriga ampla diversidade de comunidades microbianas. Condições específicas, como salinidade, disponibilidade de nutrientes e condições de anaerobiose, causadas pela constante variação diária ou sazonal da maré (ANDREOTE et al., 2012) faz do manguezal uma importante fonte de recursos com potencial biotecnológico ainda inexplorado (SIVARAMAKRISHNAN et al., 2006).

O manguezal é ainda uma fonte pouco estudada quanto ao potencial de produzir metabólitos secundários ativos por actinobactéria, como substâncias anti-inflamatória, antitumoral e agentes para o tratamento de doenças degenerativas e diabetes (HONG et al., 2009), assim como produtoras de enzimas capazes de degradar substâncias de interesse industrial. A ampla distribuição destas bactérias neste ecossistema confere ao mesmo o status de “hotspot” com potencial biotecnológico (THATOI et al., 2013). Estas se encontram altamente dispersas no solo, compondo os gêneros *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Butyrivibrio*, *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, e despertam o interesse e atenção da indústria biotecnológica uma vez que a capacidade de produzir metabólitos secundários e enzimas em grande quantidade são as principais características que esse grupo apresenta (ZHAO et al., 2006).

O estudo com organismos produtores de metabólitos e/ou enzimas capazes de auxiliar no combate as infecções tanto de origem fúngica quanto bacteriana, tem se desenvolvido em todo o mundo, com propósito de prospectar novas drogas efetivas com alto poder farmacológico capazes de combater as comunidades microbianas multirresistentes (LI et al., 2005). A aplicação industrial destas está ligada à biotecnologia a qual deve aprimorar o a enzima de interesse comercial, resultando em um produto de melhor qualidade que o tradicional (ORLANDELLI et al., 2012), visto que a sua utilização pode resultar no desenvolvimento de processos tecnológicos com maior eficiência que os naturais, diminuindo impactos ambientais (MESSIAS et al., 2011).

As actinobactérias têm sido uma fonte potencial para exploração e produção de diversos compostos, sendo inclusos produtos que possam a vir comercializados como: agroquímicos, fármacos e enzimas (GULVE; DESHMUKH, 2011). Estes microrganismos desempenham papel essencial na degradação de matéria orgânica, pois os mesmos podem vir a usar diversas fontes de carbono e energia para sua produção enzimática. Inúmeras pesquisas estão sendo realizadas cujo principal objetivo é identificar espécies capazes de produzir metabólitos, como as enzimas, com utilidade industrial (SILVA; MARTINS; MARTINS, 2015). Por produzirem uma ampla gama de metabólitos secundários de importância industrial e médica têm atraído a atenção de pesquisadores com a intenção de descobrir novas espécies e novos produtos, com potencial utilização na área científica (KUMAR et al., 2018).

## 2 | CARACTERIZAÇÃO DO ECOSISTEMA DE MANGUEZAL

Manguezal é definido como “ecossistema costeira de transição entre os ambientes terrestre e marinho, característico de zonas tropicais e subtropicais, sujeito ao regime de marés” o qual é utilizado como área de reprodução, crescimento, refúgio e alimentação para organismos marinhos, sendo essencial para proteção da costa litorânea. Na qualidade de zonas úmidas, é reconhecido como “ecossistema-chave”, cuja preservação é crítica para o funcionamento de outros ecossistemas maiores e mais diversos que se estendem além dos limites de um bosque de mangue (SCHAEFFER-NOVELLI et al., 2000).

Segundo Correia & Sovierzoski (2005), o ecossistema de manguezal é essencial para degradação de matéria orgânica e ciclagem de inúmeros nutrientes presentes tanto no sedimento deste ecossistema, quanto de ecossistemas adjacentes, sendo classificado com um dos principais ecossistemas costeiros tropicais. Embora seja relatado na literatura a importância da microbiota no solo como parte intrínseca dos processos biogeoquímicos em ecossistemas terrestres e estuarinos, há poucos trabalhos que relacionem o papel da microbiota, tanto bacteriana quanto fúngica, nos sedimentos e solos de manguezal (LANOIL et al., 2005). Além disso, ambientes como estes, cujas comunidades microbianas são ainda pouco conhecidas, podem significar grandes bancos genéticos para a pesquisa e desenvolvimento de produtos biotecnológicos, considerando que os microrganismos representam as formas de vida mais abundante mais diversificadas do planeta, e detenham a maior proporção da diversidade genética existente.

## 3 | DIVERSIDADE MICROBIANA EM SEDIMENTO DE MANGUEZAL

O solo é um sistema complexo que contém uma grande variedade de microhabitats os quais são caracterizados por propriedades físicas, químicas e biológicas específicas, sendo que fatores como materiais de origem, quantidade e qualidade de matéria orgânica presente, saturação com água, granulometria, características químicas e vegetação controlam a atividade, diversidade e estruturas das comunidades microbianas (AGNELLI et al., 2004).

A microbiota do solo é caracterizada pela abundância e diversidade e a população é maior nos poucos centímetros do topo do solo, declinando rapidamente com a profundidade. Segundo Thatoi et al. (2016), a atividade microbiana é utilizada como uma maneira de melhor entender os processos de mineralização e observar mais profundamente a intensidade dos fluxos de energia no solo (GHIZELINI et al., 2012).

O solo de manguezal é formado pela deposição de partículas de origem terrígena e marinha, orgânicas e inorgânicas, que se encontram em suspensão na água, e que se movimentam em função das correntes de fluxo e refluxo das marés (CURY, 2002). Além disso, diferente da maioria dos solos, o solo do manguezal apresenta um



gradiente de condições aeróbias e anaeróbias, uma vez que sedimentos finos como silite e argila predominam, juntamente com altas concentrações de matéria orgânica e sais (GHIZELINI et al., 2012).

A diversidade microbiana no solo está relacionada com a complexidade das interações microbianas no solo, incluindo as interações entre os microrganismos, o solo e as plantas. São importantes indicadores de qualidade ambiental, uma vez que impactos adversos que afetem a diversidade e/ou a funcionalidade da microbiota do sedimento de manguezal pode comprometer a dinâmica de interações interespecíficas e intraespecíficas e comprometer também a qualidade do solo. Logo, o constante monitoramento da diversidade microbiana no manguezal pode fornecer informações úteis sobre as mudanças que estão ocorrendo ao longo de um período de tempo devido a influências antrópicas e intervenções humanas (NUNES, 2006; RAMOND et al., 2012).

Segundo Lee et al. (2006) estudos sobre a composição microbiana e a diversidade em solo de manguezal são importantes para melhor compreensão da diversidade bacteriana, pois esta comunidade desempenha um importante papel ecológico em muitos processos ambientais, incluindo a degradação de poluentes. Segundo Cury (2006) ainda que, estes microrganismos sejam essenciais para a definição dos processos geoquímicos predominantes e para a própria manutenção da estabilidade do ecossistema, os papéis da diversidade microbiana em ecossistemas estuarinos são pouco conhecidos.

Em estudos realizados no Brasil, Dias et al. (2009) demonstrou que a microbiota bacteriana que está presente em solo de manguezal também é comumente encontrada em ambientes marinhos e estuarinos uma vez que os principais grupos a serem identificados neste tipo de sedimento compõe três ordens: Actinomycetales, Bacillales e Vibrionales. Dentre as três ordens citadas a ordem Actinomycetales é a mais diversa.

Kumar et al. (2018) afirma que 30% da população total de microrganismos no solo corresponde à actinobactérias. Segundo Cury (2006) os principais grupos taxonômicos pertencentes ao domínio Bactéria encontrados em solo de manguezal são Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Cyanobacteria, Deferribacteria, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Nitrospirae, Planctomycetes e Proteobacteria.

Os microrganismos são fundamentais para manutenção da produtividade, conservação e recuperação do manguezal, e encontram-se diretamente ligados à transformação de nutrientes, fotossíntese, fixação de nitrogênio, metanogênese, solubilização de fosfato, e produção de outras substâncias incluindo antibióticos e enzimas sendo fontes de produtos de interesse biotecnológicos como, por exemplo, bactérias produtoras de bioemulsificantes (SANTOS et al., 2011a; SANTOS et al., 2011b). Além disso, são a mais importante fonte de produção enzimática, uma vez que as enzimas com maior importância industrial incluem proteases, enzimas que hidrolisam carboidratos e enzimas lipolíticas. As aplicações mais comuns dessas enzimas são: processamento de alimentos, produção de bebidas, nutrição animal,

couro, papel, polpa, têxtil, detergente entre outras (SYED et al., 2009).

O estudo realizado por Insam (2001) demonstra que as enzimas presentes em solo de manguezal são predominantemente de origem microbiana, sendo que as enzimas extracelulares de interesse estão envolvidas na degradação de paredes celulares de microrganismos e plantas, geração de húmus e mineralização de fosfato e fósforo presente em compostos orgânicos.

#### 4 | ACTINOBACTÉRIAS

O filo *Actinobacteria* representa uma das maiores unidades taxonômicas entre as linhagens do domínio *Bactéria*, e a divergência genética entre as actinobactérias e outros grupos de bactérias é muito antiga. A classe *Actinobacteria* compreende 15 ordens, 43 famílias e 203 gêneros, no qual foi verificado através do padrão de ramificação do gene 16S rRNA, assim como em assinaturas específicas do táxon (GOODFELLOW et al., 2012; BARKA et al., 2016).

As actinobactérias são bactérias Gram-positivas com alto teor de G+C (guanina + citosina), altamente dispersos no solo, compondo os gêneros *Actinomyces*, *Arthrobacter*, *Bifidobacterium*, *Butyrivibrio*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Streptomyces*. Segundo Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (GOODFELLOW et al., 2012) as actinobactérias compartilham duas características: todas são Gram-positivas e apresentam alta razão de guanina/citosina em seu DNA, podendo exceder 70% do total de bases nucleotídicas. São organismos considerados procariotos, e uma das características de diferencia este grupo de outras eubactérias é o seu crescimento micelial, que se dá pela ramificação das hifas e extensão das pontas, o que lhes deu o nome actinobactérias (BARKA et al., 2016).

Membros dessa classe são consideradas uma das mais ricas fontes de produtos naturais, como substâncias antitumorais e antibióticos, sendo o gênero *Streptomyces* o mais evidente. Estimativas apontam que apenas 10% de todos os produtos naturais desses organismos tenham sido descoberto, sendo que as actinobactérias podem representar cerca de 45% dos metabólitos secundários produzidos (GOODFELLOW et al., 2012).

Eles são encontrados espalhados ao redor do mundo, em vários ecossistemas, entre eles os aquáticos e terrestres. São importantes contribuintes na ciclagem de nutrientes e na decomposição do húmus. Ocorrem em uma grande variedade de habitats e são capazes de crescer em uma vasta diversidade de substratos, sendo comumente encontradas no solo. Além disso, as actinobactérias são encontradas em diferentes nichos ecológicos, uma vez que o grupo inclui gêneros patogênicos (*Mycobacterium* spp., *Nocardia* spp., *Tropheryma* spp., *Corynebacterium* spp., *Propionibacterium* spp.), ambientais (*Streptomyces* spp., *Leifsonia* spp. e *Frankia*), e associados ao trato gastrointestinal (*Bifidobacterium* spp.) (AZUMA, 2011).

Devido à variação dos fatores abióticos, como a salinidade alta umidade, concentrações baixas de oxigênio e o nível das marés, os microrganismos têm produzido metabólitos incomuns e também altamente responsivos às mudanças ambientais. O manguezal tem sido alvo de pesquisadores para a descoberta de novos compostos bioativos pela sua rica biodiversidade sendo uma valiosa fonte de metabólitos secundários (AZMAN et al., 2015). Segundo estudo realizado por Xu et al. (2014) as actinobactérias isolados de manguezal mostraram a capacidade de produzir substâncias anti-infectantes, antitumorais, inibidoras de proteínas tirosina fosfatase, assim como enzimas extracelulares, como a protease, celulase e amilase. No solo, os actinobactérias representam grande parte da população microbiana figurando entre eles bactérias do gênero *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Rhodococcus* e *Salinispora* (BARKA et al., 2016).

## 5 | IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E POTENCIAL BIOTENCOLÓGICO

Diversos reinos produzem metabólitos secundários, podendo citar como exemplos: plantas (compostos bioativos para proteção), insetos (metabólitos para comunicação ou proteção) e ainda entre os eucariotos, visto que os fungos são grandes produtores de metabólitos secundários com diversos tipos de enzimas e antimicrobianos. Dentre os microrganismos bacterianos, evidencia-se as actinobactérias as quais podem sintetizar além de diversas complexos enzimáticos, a maioria dos antibióticos conhecidos (HECK, 2007).

O metabolismo secundário de microrganismos pode ser visto como a produção de compostos que aparentemente não exercem uma função para o organismo, já que este pode sobreviver mesmo sem a sua formação. Assim, uma das justificativas para a produção destas substâncias seria que, por serem produzidas dentro de uma série de reações bioquímicas que ocorrem nas células, quando o resultado é um produto que favorece a sobrevivência, este mecanismo é incorporado às reações primárias, como os pigmentos, que protegem contra os danos da luz ultravioleta e são importantes fatores de virulência (AZUMA, 2011).

Os metabólitos dos microrganismos produzidos no meio em que crescem são conhecidos há muito tempo. A função desses produtos pode ser ecológica-antagônica, inibindo o crescimento ou desenvolvimento de competidores (KUMAR et al., 2018) ou mesmo promovendo associações com outros microrganismos, plantas superiores ou fungos micorrízicos (HALLMANN e SIKORA, 1996), sendo assim, é necessário a ação de vários genes para a produção dos mesmos e proteção contra os efeitos da substância produzida (VENTURA et al., 2007).

As actinobactérias são mais conhecidos pela sua capacidade em produzir substâncias de interesse econômico, representando cerca de dois terços dos antibióticos oriundos de microrganismos. São consideradas como o grupo de microrganismos com maior capacidade de formar moléculas complexas, como os

antibióticos e enzimas extracelulares, visto que o gênero *Streptomyces* é considerado um dos maiores produtores de antibióticos na indústria farmacêutica (VENTURA et al., 2007; LIAO et al., 2016). Entre 1955 e 1962, 80% dos antibióticos originados a partir de actinobactérias já haviam sido descobertos, entre os quais o principal contribuinte foi o gênero *Streptomyces* (WATVE et al., 2001).

A ação seletiva exercida sobre patógenos bacterianos e fúngicos produzida por estes metabólitos bioativos isolados dos microrganismos inaugurou a era antibiótica e vem nos beneficiando através de alguns tipos de fármacos, tais como as penicilinas, cefalosporinas, tetraciclina, e muitos outros. A penicilina, isolada de *Streptomyces griseus*, foi um dos primeiros antibióticos a serem descobertos, e em 1953, a descoberta da Vancomicina, isolada de *Amycolatopsis orientalis*. Além disso, a bactéria *Streptomyces coelicolor* é um modelo utilizado para estudar o controle da produção de antibióticos, e *Micromonospora rifamycinica*, isolada de mangue, produz os antibióticos Ritamicina S (1) e seu isômero geométrico Ritamicina S (2) (AZMAN et al., 2015; BARKA et al., 2016).

Sabe-se que produção de metabólitos é dependente do meio de cultura utilizado, assim como a temperatura de incubação e período, sendo que para a sua produção, o meio de cultura necessita de fósforo inorgânico, íons metálicos, fontes de nitrogênio e carbono. A mesma se dá quando há condições adversas para o microrganismo, como a falta de nutrientes. Nesse momento, a bactéria inicia o processo de morte celular programada para assimilar os nutrientes para a sua sobrevivência, e a produção de antibióticos têm como o objetivo proteger esses nutrientes de outros microrganismos (SRINIVASAN; LAXMAN; DESHPANDE, 1991; BARKA et al., 2016).

Em estudos realizados em ecossistema de manguezal no Brasil por Schneider (2017), sabe-se que a microbiota bacteriana presente em solo de manguezal da Baía de Paranaguá, Paranaguá é composta por actinobactérias, gênero *Streptomyces*, com capacidade de produzir metabólitos ativos com o potencial inibitório de microrganismos bacterianos patogênicos como *Staphylococcus aureus* ATCC 25023, e fúngicos como *Candida albicans* ATCC 10231 através da técnica de difusão em ágar utilizando blocos de gelose e extrato bruto.

Os produtos naturais microbianos ainda parecem ser a fonte mais promissora dos futuros antibióticos. Além disso, utilizando estudos moleculares recentes, tais como dados de sequenciamento genômico, tem sido possível buscar genes codificadores de compostos e descobrir novos produtos naturais (AZMAN et al., 2015; LIAO et al., 2016).

As actinobactérias têm grande importância econômica e biotecnológica. Além disso, a produção de diversas enzimas como celulolíticas, proteolíticas, aminolíticas, lignolíticas, quitinolíticas e solubilização de fosfatados, faz com que as mesmas sejam essenciais na degradação de matéria orgânica do manguezal (SIVAKUMAR et al., 2007; LU et al., 2009).

## 6 | POTENCIAL APLICAÇÃO ENZIMÁTICA DAS ACTINOBACTÉRIAS

Enzimas são proteínas com a capacidade de acelerar reações, e fazem parte das reações químicas dos organismos. São moléculas que atuam em proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos, aminoácidos, carboidratos, entre outros (ORLANDELLI et al., 2012).

As bactérias isoladas de ambientes marinhos e terrestres possuem alta capacidade de produção enzimática, tais como a amilase, celulase, fosfolipase, lipase, protease e urease, as quais podem ter potencial aplicação na biotecnologia. As enzimas de origem bacteriana são mais estáveis quanto a sua utilização quando comparada às enzimas produzidas por plantas e animais, uma vez que quando comparada a enzimas fúngicas, as bacterianas são produzidas em maior quantidade. No entanto, o ambiente marinho, regiões polares, mar profundo e o ecossistema de manguezal, têm sido pouco explorado quanto a produção de metabólitos secundários de isolados de microrganismos (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; LIAO et al., 2016), como exemplo as actinobactérias.

A amilase é responsável pela hidrólise do amido, e é a enzima mais utilizada nas indústrias de alimentação (panificação) e também na indústria textil, tendo como função remodelar o material das roupas. O gênero *Streptomyces* está entre das bactérias produtoras de amilase (GRIEBELER et al., 2015; KAFILZADEH; DEHDARI, 2015).

Bactérias produtoras de celulase, capazes de hidrolisa as substâncias celulósicas, podem ser utilizadas na indústria têxtil, alimentícia e de cerveja uma vez que as actinobactérias podem ser uma potencial fonte para a síntese de celulase. Bactérias isoladas de ambientes semiáridos e marinhos, a uma temperatura de 28 e 30 °C, com capacidade celulolítica incluem os gêneros *Streptomyces* e *Micromonospora* os quais possuem altos níveis de atividade enzimática (GULVE; DESHMUKH, 2011; MOHAN; CHARYA, 2012; SILVA; MARTINS; MARTINS, 2015).

As lipases são enzimas capazes de quebrar moléculas de lipídios dentro das células de um organismo. Embora também seja produzida por animais a plantas, a obtenção da mesma têm sido feita comumente através de microrganismos como fungos e actinobactérias (*Streptomyces cinnamomeus*). No mercado mundial, a lipase é considerada o terceiro maior grupo na venda com aplicações na indústria de detergentes. Sua inserção em detergentes líquidos substitui a utilização de polissulfatos, diminuindo assim os impactos no ambiente. Outras aplicações incluem: produção de perfumes e cosméticos, indústria alimentícia, farmacêutica, tratamento de efluentes e fabricação de combustível (MESSIAS et al., 2011; MOHAN; CHARYA, 2012).

As fosfolipases se referem a um grupo de enzimas capazes de hidrolisa ligações éster em glicerofosfolipídeos. Essa enzima ocorre geralmente em microrganismos e tecidos de plantas e mamíferos, estando relacionada à toxicidade de patógenos de plantas e animais. Além dos fungos, as bactérias também são produtoras dessa



enzima, como por exemplo, as bactérias do gênero *Streptomyces* as quais produzem grandes quantidades de fosfolipase D (KATO et al., 1984; GHANNOUM, 2000; CAMPOS; BARONI, 2010).

As proteases são responsáveis pela aceleração da hidrólise de proteínas à peptídeos e aminoácidos, de extrema importância para os processos fisiológicos dos organismos. Sua aplicação envolve a indústria de tratamento de couro, detergentes, farmacêutica, agrícola e alimentícia. Na indústria, as enzimas oriundas de actinobactérias compõe cerca de 40% de todas as proteases utilizadas (CUZZI et al., 2011; MOHAN; CHARYA, 2012; GRIEBELER et al., 2015).

Por fim, a urease é descrita como uma enzima intra e extracelular, e está presente na maioria dos reinos da planta e dos microrganismos. A urease bacteriana é de extrema importância para as bactérias em ambientes contendo ureia, sendo indispensável para a sua sobrevivência na maioria dos casos. Estas enzimas quando imobilizadas podem ser utilizadas para diagnosticar e tratar doença, como por exemplo, a hipertensão, como sensores biotecnológicos, para a biorremediação, produção de antibióticos e vacinas e na indústria alimentícia (SUJOY; APARNA, 2013; MURALIDHAR; KHURANA; SHARMA, 2014).

Em pesquisa de potencial enzimático realizado por Almeida (2017) utilizando sedimento de manguezal da Baía de Paranaguá, Paraná, pode-se concluir que as actinobactérias isoladas deste sedimento têm potencial enzimático aminolítico, celulolítico, fosfolipídico, proteolítico e ureolítico. Dentre os 10 isolados testados, destacaram-se 3 isolados de actinobactéria do gênero *Streptomyces* que apresentaram elevados índices enzimáticos para a amilase, fosfolipase e protease.

A busca por novos metabólitos naturais é uma necessidade, visto o aumento de patógenos resistentes a antibióticos, assim como alternativas para os produtores de enzimas de utilização comercial, resultando no decréscimo do preço das enzimas (AZMAN et al., 2015).

## REFERÊNCIAS

AGNELLI, A.; ASCHER, J.; CORTI, G.; CECCHERINI, M. T.; NANNIPIERI, P.; PIETRAMELLARA, G. **Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA.** Soil Biology and Biochemistry, v. 36, n. 5, p. 859–868, 2004.

ALMEIDA, J. C. R. **Avaliação da atividade enzimática de actinomicetos isolados de manguezal na Baía de Paranaguá, Paraná.** 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual do Paraná - Campus Paranaguá, Paranaguá, 2017.

ANDREOTE, F. D.; JIMÉNEZ, D. J.; CHAVES, D.; DIAS, A. C. F.; LUVIZOTTO, D. M.; DINI-ANDREOTE, F.; FASANELLA, C. C.; LOPEZ, M. V.; BAENA, S.; TAKETANI, R. G.; MELO, I. S. de. **The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics.** PLoS ONE, v. 7, n. 6, 2012.

AZMAN, A. S.; OTHMAN, I.; VELU, S. S.; CHAN, K.-G.; LEE, L. H. **Mangrove rare actinobacteria: taxonomy, natural compound, and discovery of bioactivity.** Frontiers in microbiology, v. 6, p. 856,



2015.

AZUMA, MARIANA VIEIRA PORSANI. Actinobactérias com potencial biotecnológico isoladas da região entre-marés da Ilha do Mel, PR, Brasil. In: AZUMA, MARIANA VIEIRA PORSANI. **Actinobactérias com potencial biotecnológico isoladas da região entre-marés da Ilha do Mel, PR, Brasil**. 2011. Dissertação (Mestrado em em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

BARKA, E. A.; VATSA, P.; SANCHEZ, L.; GAVEAU-VAILLANT, N.; JACQUARD, C.; KLENK, H.-P.; CLÉMENT, C.; OUHDOUCH, Y.; WEZEL, G. P. V. **Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria**. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 80, n. 1, p. 1-43, 2016.

CAMPOS, F. L.; BARONI, F. A. **Isolados de *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii* e *C. laurentii* produtores de protease e fosfolipase**. Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology, v. 39, n. 2, p. 83-90, 2010.

CORREIA, M. D.; SOVIERZOSKI, H. H. **Ecosistemas marinhos : recifes, praias e manguezais**. Alagoas: Edufal, 2005.

CURY, J. C. **Atividade microbiana e diversidades metabólica e genética em solo de mangue contaminado com petróleo**. 2002. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de São Paulo: São Paulo, 2002.

CURY, J. C. **Diversidade de Bacteria e Archaea em solos de mangue e marisma**. 2006. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de São Paulo: São Paulo, 2006.

CUZZI, C.; LINK, S.; VILANI, A.; ONOFRE, S. B. **Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis dracunculifolia* D.C (Asteraceae)**. Global Science and Technology, v. 4, n. 2, p.47-57, 2011.

DEMAIN, A. L. **From natural products discovery to commercialization: A success story**. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 33, n. 7, p. 486-495, 2006.

DIAS, A. C. F.; ANDREOTE, F. D.; DINI-ANDREOTE, F.; LACAVAL, P. T.; SÁ, A. L. B.; MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. **Diversity and biotechnological potential of culturable bacteria from Brazilian mangrove sediment**. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 25, n. 7, p. 1305–1311, 2009.

DUARTE, M. W.; DAMASCENO, R. G.; SALAMONI, S. P.; OLIVEIRA, M. F. de; VAN-DER-SAND, S. T. **Atividade antimicrobiana e produção de enzimas extracelulares por actinomicetos isolados de solo: produção de metabólitos secundários por actinomicetos**. 2009. Trabalho de conclusão (Ciências biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Porto Alegre, 2009.

GHANNOUM, M. A. **Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis**. Clinical microbiology reviews, v. 13, n. 1, p. 122-143, 2000.

GOODFELLOW, M.; KÄMPFER, P.; BUSSE, H.; TRUJILLO, M. E.; SUZUKI, K.; LUDWIG, W.; WHITMAN, W. B. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. v. 5, 2 ed., Editora Springer, 2012.

GRIEBELER, N. E.; BORTOLI, V.; ASTOLFI, A. L.; DARONCH, N. A.; SCHUMANN, A. C.; SALAZAR, L. N.; CANSIAN, R. L.; BACKES, G. T.; ZENI, J. **Seleção de fungos filamentosos produtores de amilases, proteases, celulases e pectinases**. A Revista Acadêmica: Ciência Animal, v. 13, p. 13-22, 2015.

GHIZELINI, A. M; MENDONÇA-HAGLER, L. C. S.; MACRAE, A. **Microbial diversity in brazilian mangrove sediments - a mini review**. Brazilian Journal of Microbiology, v. 43, n. 4, p. 1242–1254, 2012.

- GULVE, R. M.; DESHMUKH, A. M. **Enzymatic activity of actinomycetes isolated from marine sediments.** Recent Research in Science and Technology, v. 3, n. 5, p. 80-83, 2011.
- HALLMANN, J.; SIKORA, R. A. **Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil-borne plant pathogenic fungi.** European Journal of Plant Pathology, v. 102, n. 2, p. 155–162, 1996.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. **Industrial applications of microbial lipases.** Enzyme and Microbial Technology, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.
- HECK, M. G. **Produção de compostos antimicrobianos provenientes do metabolismo de *Streptomyces* sp. Linhagem 2S.** 2007. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Porto Alegre, 2007.
- HONG, K.; GAO, A. H.; XIE, Q. Y.; GAO, H.; ZHUANG, L.; LIN, H. P.; YU, H. P.; LI, J.; YAO, X. S.; GOODFELLOW, M.; RUAN, J. S. **Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China.** Marine Drugs, v. 7, n. 1, p. 24–44, 2009.
- INSAM, H. **Developments in soil microbiology since the mid 1960s.** Geoderma, v. 100, n. 3-4, p. 389-402, 2001.
- KAFILZADEH, F.; DEHDARI, F. **Amylase activity of aquatic actinomycetes isolated from the sediments of mangrove forests in south of Iran.** The Egyptian Journal of Aquatic Research, v. 41, n. 2, p. 197-201, 2015.
- KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B. L. **Biology of mangroves and mangrove ecosystems.** Advances in Marine Biology, v. 40, p. 81-251, 2001.
- KATO, S.; KOKUSHO, Y.; MACHIDA, H.; IWASAKI, S. **Isolation and identification of phospholipase D producing actinomycetes.** Agricultural and biological chemistry, v. 48, n. 9, p. 2181-2188, 1984.
- KUMAR, J. G. S. P.; GOMATHI, A.; VASCONCELOS, V.; GOTHANDAM, K. M. **Bioactivity assessment of Indian origin—mangrove actinobacteria against *Candida albicans*.** Marine drugs, v. 16, n. 2, p. 60, 2018.
- LANOIL, B. D.; LA DUC, M. T.; WRIGHT, M.; KASTNER, M.; NEALSON, K. H.; BARTLETT, D. **Archaeal diversity in ODP legacy borehole 892b and associated seawater and sediments of the Cascadia Margin.** FEMS Microbiology Ecology, v. 54, n. 2, p. 167–177, 2005.
- LEE, S. Y.; DUNN, R. J. K.; YOUNG, R. A.; CONNOLLY, R. M.; DALE, P. E. R.; DEHAYR, R.; LEMCKERT, C. J.; MCKINNON, S. POWELL, B.; TEASDALE, P. R.; WELSH, D. T. **Impact of urbanization on coastal wetland structure and function.** Austral Ecology, v. 31, n. 2, p. 149–163, 2006.
- LI, H.; QING, C.; ZHANG, Y.; ZHAO, Z. **Screening for endophytic fungi with antitumour and antifungal activities from Chinese medicinal plants.** World Journal of Microbiology & Biotechnology, v. 21, n. 8-9, p. 1515–1519, 2005.
- LIAO, L.; CHEN, R.; JIANG, M.; TIAN, X.; LIU, H.; YU, Y.; FAN, C.; CHEN, B. **Bioprospecting potential of halogenases from Arctic marine actinomycetes.** BMC Microbiology, v. 16, n. 1, p. 34, 2016.
- LU, Y.; DONG, X.; LIU, S.; BIE, X. **Characterization and identification of a novel marine *Streptomyces* sp. produced antibacterial substance.** Marine Biotechnology, v. 11, n. 6, p. 717–724, 2009.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. **Lipases Microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas.** Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.

MOHAN, G. M.; CHARYA, M. A. S. **Enzymatic activity of fresh water actinomycetes.** International Research Journal of Pharmacy, v. 3, n. 11, p. 193-197, 2012.

MURALIDHAR, K.; KHURANA, J.; SHARMA, V. **Urease (EC3.5.1.5): A perspective.** World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, v. 3, p. 923-948, 2014.

NUNES, G. **Diversidade e estrutura de comunidades de Bacteria e Archaea em solo de mangue contaminado com hidrocarbonetos de petróleo.** 2006. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de São Paulo: Piracicaba, 2006.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. **Enzimas de interesse industrial: Produção por fungos e aplicações.** Revista de Saúde e Biologia, v. 7, n. 3, p. 97-109, 2012.

RAMOND, J. B.; WELZ, P. J.; COWAN, D. A.; BURTON, S. G. **Microbial community structure stability, a key parameter in monitoring the development of constructed wetland mesocosms during start-up.** Research in Microbiology, v. 163, n. 1, p. 28–35, 2012.

SANTOS, H. F.; CARMO, F. L.; PAES, J. E. S.; ROSADO, A. S.; PEIXOTO, R. S. **Bioremediation of mangroves impacted by petroleum.** Water, Air, and Soil Pollution, v. 216, n. 1–4, p. 329–350, 2011a.

SANTOS, H. F.; CURY, J. C.; CARMO, F. L.; SANTOS, A. L.; TIEDJE, J.; VAN- ELSAS, J. D.; ROSADO, A. S.; PEIXOTO, R. S. **Mangrove bacterial diversity and the impact of oil contamination revealed by pyrosequencing: Bacterial proxies for oil pollution.** PLoS ONE, v. 6, n. 3, p. 1–8, 2011b.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRÓN-MOLERO, G.; SOARES, M. L. G.; DE-ROSA, T. **Brazilian mangroves.** Aquatic Ecosystem Health & Management, v. 3, n. 4, p. 561–570, 2000.

SCHNEIDER, G. X. **Isolamento e atividade antimicrobiana de actinobactérias de solo de manguezal na Baía de Paranaguá-PR.** 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual do Paraná - Campus Paranaguá, Paranaguá, 2017.

SILVA, V. M. A.; MARTINS, C. M.; MARTINS, S. C. S. **Atividade celulolítica de actinobactérias de região semiárida do Ceará.** Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, v. 11, n. 21, p. 2026-2036, 2015.

SIVAKUMAR, K.; SAHU, M. K.; THANGARADJOU, T.; KANNAN, L. **Research on marine actinobacteria in India.** Indian Journal of Microbiology, v. 47, n. 3, p. 186–196, 2007.

SIVARAMAKRISHNAN, S.; GANGADHARAN, D.; NAMPOOTHIRI, K. M.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.  **$\alpha$ -amylases from microbial sources – an overview on recent developments.** Food Technology and Biotechnology, v. 44, n. 2, p. 173–184, 2006.

SRINIVASAN, M. C.; LAXMAN, R. S.; DESHPANDE, M. V. **Physiology and Nutritional aspects of actinomycetes: an overview.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 7, n. 2, p. 171-184, 1991.

SUJOY, B.; APARNA, A. **Enzymology, immobilization and applications of urease enzyme.** International Research Journal of Biological Science, v. 2, p. 51-56, 2013.

SYED, D. G.; AGASAR, D.; PANDEY, A. Production and partial purification of alpha-amylase from a novel isolate Streptomyces gulbargensis. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology,** v.

36, n. 2, p. 189–94, 2009.

THATOI, H.; BEHERA, B. C.; DANGAR, T. K.; MISHRA, R. R. **Microbial Biodiversity in Mangrove soils of Bhitarkanika, Odisha, India.** International Journal of Environmental Biology, v. 2, n. 2, p. 50-58, 2016.

THATOI, H.; BEHERA, B. C.; MISHRA, R. R.; DUTTA, S. K. **Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: a review.** Annals of Microbiology, v. 63, n. 1, p. 1–19, 2013.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; TAUCH, A.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G. F.; CHATER, K. F.; SINDEREN, D. **Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum.** Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 71, n. 3, p. 495-548, set. 2007.

WATVE, M. G.; TICKOO, R.; JOG, M. M.; BHOLE, B. D. **How many antibiotics are produced by the genus Streptomyces?** Archives of Microbiology, v. 176, n. 5, p. 386–390, 2001.

XU, D.-B.; YE, W.-W.; HAN, Y.; DENG, Z.-X.; HONG, K. **Natural products from mangrove actinomycetes.** Marine drugs, v. 12, n. 5, p. 2590-2613, 2014.

ZHAO, H.; PARRY, R. L.; ELLIS, D. I.; GRIFFITH, G. W.; GOODACRE, R. **The rapid differentiation of Streptomyces isolates using Fourier transform infrared spectroscopy.** Vibrational Spectroscopy, v. 40, n. 2, p. 213–218, 2006.

## IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS COM A CAPACIDADE DE BIODEGRADAÇÃO DO HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO

### **Juliana Barbosa Succar**

Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), Laboratório de Pesquisa em Biotecnologia Ambiental, Rio de Janeiro - RJ

### **Andressa Sbano da Silva**

Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), Laboratório de Pesquisa em Biotecnologia Ambiental, Rio de Janeiro - RJ

### **Lidiane Coelho Berbert**

Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), Laboratório de Pesquisa em Biotecnologia Ambiental, Rio de Janeiro - RJ

### **Vinícius Ribeiro Flores**

Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), Laboratório de Pesquisa em Biotecnologia Ambiental, Rio de Janeiro - RJ

### **João Victor Rego Ferreira**

Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), Laboratório de Pesquisa em Biotecnologia Ambiental, Rio de Janeiro - RJ

### **Alexander Machado Cardoso**

Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), Laboratório de Pesquisa em Biotecnologia Ambiental, Rio de Janeiro - RJ

### **Ida Carolina Neves Direito**

Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), Laboratório de Pesquisa em Biotecnologia Ambiental, Rio de Janeiro - RJ

**RESUMO:** O uso de pesticidas aumentou significativamente no mercado brasileiro nos

últimos anos. Os herbicidas constituem o segundo grupo de pesticidas mais utilizados no Brasil, sendo o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) um dos mais utilizados nas lavouras brasileiras. O uso indiscriminado destes compostos pode levar a contaminação ambiental e a prejuízos à saúde humana. Estudos buscam identificar microrganismos do solo com a capacidade de degradação destes pesticidas para uso em biorremediação. Este trabalho teve como objetivo identificar cepas bacterianas, com capacidade de degradação do herbicida 2,4-D, oriundas da rizosfera de chicória (*Cichorium endivia L.*). Foi realizado o isolamento bacteriano e identificação de uma cepa através de testes bioquímicos e sequenciamento. A cepa isolada foi identificada como do gênero *Delftia*, que apresenta espécies relacionadas com degradação de pesticidas.

**PALAVRAS-CHAVES:** 2,4-D, microbiota do solo, pesticida

IDENTIFICATION OF BACTERIA  
WITH THE BIODEGRADATION  
CAPACITY OF THE HERBICIDE

2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID

**ABSTRACT:** The pesticide use has increased significantly on the Brazilian market in the recent years. The herbicides are the second

group more used in Brazil, being the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) one of the most used in the Brazilians crops. The indiscriminate use of these compounds may result in an contamination and damage to human health. Studies aim to identify novel soil microorganisms with the degradation capacity of these pesticides for use in bioremediation. This work aimed to identify bacterial strains with degradation capacity of the 2,4-D herbicide from the chicory rhizosphere (*Cichorium endivia* L.). Bacterial isolation and identification of a strain were performed through biochemical tests and sequencing. The isolated strain was identified as *Delftia* sp., which presents many species related to pesticide degradation.

**KEYWORDS:** 2,4-D, soil microbiota, pesticide

## 1 | INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, a agricultura mundial vem crescendo em produtividade e área cultivada, acompanhada pelo uso intenso de pesticidas para atender a demanda da população mundial (ARMAS & MONTEIRO, 2005; EMBRAPA, 2018). Segundo Veiga (2007), no Brasil, a produção agrícola é dependente da utilização de pesticidas para controlar pragas, doenças e plantas daninhas que reduzem a produção nas lavouras, tendo como consequência o aumento da produtividade, ou seja, uma maior produção agrícola em uma determinada área plantada.

Desde 2009, o Brasil está entre os maiores consumidores de pesticidas a nível mundial, sendo responsável por 1/5 do consumo deste tipo de produto (DELLAMATRICE & MONTEIRO, 2014; FAO, 2019). Trata-se de 19% de todos os pesticidas sintetizados ao redor do mundo (CASSAL *et al.*, 2014). Economicamente falando, a venda de pesticidas movimentou 7,3 bilhões de dólares no mundo (CASSAL *et al.*, 2014). Dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Observatório da Indústria dos Agrotóxicos da Universidade Federal do Paraná mostraram que, no período de 1992 a 2012, o mercado mundial de agrotóxicos cresceu 93%, enquanto que o mercado brasileiro cresceu 190% (CASSAL *et al.*, 2014).

O uso de maneira inadequada de pesticidas pode levar à contaminação dos solos e do ambiente de um modo geral, o que tem gerado preocupações com relação ao comportamento destes compostos no ambiente. Apesar de serem muito utilizados na agricultura, podem oferecer perigo para o homem dependendo da toxicidade, do grau de contaminação e do tempo de exposição (CASTRO & CONFALONIERI, 2005; EMBRAPA, 2018). Estima-se que só no setor agrícola, cerca de 12 milhões de trabalhadores rurais são expostos diariamente aos pesticidas (OLIVEIRA-SILVA & MEYER, 2003). Sem as devidas precauções e cuidados em relação a manipulação, produção, estocagem e destino final dos pesticidas, não só o meio ambiente corre risco, mas também a saúde das pessoas que de alguma forma entram em contato com tais produtos (FERREIRA *et al.*, 2014; EMBRAPA, 2018). A utilização destes agentes químicos gerou a contaminação de grãos, frutas, legumes, hortaliças e verduras,



trazendo inúmeros malefícios ao meio ambiente, produtores rurais e aos consumidores (CISCATO, 2008). Os efeitos sobre a exposição ocupacional de trabalhadores rurais podem variar desde sintomas menos severos como dificuldades para dormir, dor de cabeça, tontura, náusea, vômito e suor excessivo, até a diminuição das defesas imunológicas, o desenvolvimento de fraqueza muscular e broncoespasmos que podem progredir para convulsões e coma, além de aborto, impotência sexual, alterações do humor e distúrbios do comportamento, como surtos psicóticos e até mesmo câncer (LUNDBERG *et al.*, 1997; FERREIRA *et al.*, 2014; INCA, 2018).

Os pesticidas são divididos em diferentes classes, dentre as quais os herbicidas, fungicidas, acaricidas, algicidas, larvicidas e inseticidas (BRASIL, 1989). Os pesticidas cujos alvos são as plantas daninhas são classificados como herbicidas, sendo um exemplo deste grupo o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). As plantas daninhas têm efeitos negativos na produção, uma vez que competem com a cultura por espaço, água, luz e, principalmente, nutrientes; além de serem muitas vezes hospedeiras de pragas e doenças. O herbicida 2,4-D é o segundo mais utilizado nas lavouras brasileiras (IBGE, 2015), principalmente nas plantações de cana-de-açúcar.

Uma dificuldade para o desenvolvimento de uma forma eficiente de remoção de resíduos de pesticidas do meio ambiente é o fato de que a persistência do pesticida no solo depende das características do solo, especialmente do tipo de argila, e dos fatores climáticos tais como radiação, temperatura, umidade e oxigenação (BURNS, 1975; *apud* DIREITO, 2009). É a associação destes fatores, juntamente com as características da molécula, que determinam o tempo de vida dos pesticidas no ambiente.

No solo, o destino do 2,4-D pode ser afetado por vários processos como, por exemplo, o escoamento superficial, adsorção, lixiviação, degradação química e microbiológica (ATTERBY *et al.*, 2002). Segundo Atterby *et al.* (2002), os microrganismos e as plantas são capazes de degradar diferentes compostos e devolver ao meio ambiente, de modo a reciclar estas substâncias e minimizar seu impacto ambiental, sendo os agentes biológicos mais importantes para biorremediação. Os microrganismos assumem papel ainda mais relevante que os vegetais quando consideramos sua grande adaptabilidade tanto ao uso de diferentes moléculas como fonte de carbono e energia como em relação às mais variadas condições ambientais (MADIGAN *et al.*, 2004a).

Existem vários estudos quanto à distribuição dos microrganismos nos mais diferentes ambientes (MADIGAN *et al.*, 2004a). Quando se pensa em solo, especialmente em sistemas agrícolas, a comparação é feita entre rizosfera (solo sob influência radicular) e bulk (solo sem influência radicular). A rizosfera apresenta maior abundância das populações bacterianas nas proximidades das raízes do que a observada em bulk (SMALLA *et al.*, 2001).

Segundo SINGER *et al.* (2003), a existência de similaridades entre compostos aromáticos vegetais e alguns herbicidas com estrutura aromática (ANVISA, 2004)

poderia explicar a ocorrência dessas rotas de degradação nos microrganismos do solo. A diversidade dos compostos oriundos do metabolismo secundário vegetal é a resposta às perturbações bióticas e abióticas (FLORES *et al.*, 1999) e o reflexo da interação entre plantas, microrganismos e insetos (SINGER *et al.*, 2003). A co-evolução entre estas três categorias de organismos é, provavelmente, a responsável pelo desenvolvimento das rotas de degradação presentes nos microrganismos do solo. Outro aspecto levantado por Singer *et al.* (2003) é a existência de similaridades estruturais entre os compostos aromáticos vegetais e os poluentes, o que apresenta a ideia de que as rotas de degradação de pesticidas existem naturalmente em função dessas similaridades. Essa influência pode ser percebida pelo fato da degradação de pesticidas ser mais eficiente na rizosfera devido ao elevado número de microrganismos e/ou a absorção da substância pelas plantas (PIUTTI *et al.*, 2003; SUN *et al.*, 2004).

Embora a aplicação de pesticidas em monocultivos realizados em grande escala seja uma prática difícil de ser abolida em função da dificuldade de práticas rápidas e eficientes de controle de pragas, doenças e plantas daninhas, existe uma busca por tecnologias alternativas que gerem menor impacto ao meio ambiente. Segundo Rodrigues e Andrietta (2010), também há uma preocupação geral em desenvolver formas eficientes de remoção de resíduos de pesticidas do meio ambiente. É neste contexto que a biodegradação é uma alternativa para a remoção de herbicidas do ambiente, uma vez que na microbiota do solo existem microrganismos capazes de degradarem pesticidas, entre eles o herbicida 2,4-D. A identificação destes microrganismos é a primeira etapa para os estudos de biorremediação. Neste trabalho, apresentamos a estratégia de estudo para a identificação de bactérias com a capacidade de degradação do herbicida 2,4-D.

## 2 | METODOLOGIA

### 2.1 Isolamento Das Bactérias Do Solo Com Capacidade De Degradação Do 2,4-D

Uma vez coletada amostra de solo da rizosfera de Chicória (*Cichorium endivia* L.), foi pesado 0,5 g de amostra do solo e diluído a  $10^{-1}$  em solução salina 0,85% (NaCl p/v). O material foi incubado a 30°C, por 50 minutos a 150 rpm. Foi preparada diluição seriada em solução salina de  $10^{-2}$  a  $10^{-7}$ . De cada diluição de amostra foram plaqueados 200 µL em cada placa de petri contendo meio diferencial MEMB (CHONG, 2005). Este meio permite uma pré-seleção das bactérias pela coloração das colônias, uma vez que bactérias degradadoras do 2,4-D devem apresentar a coloração avermelhada. O plaqueamento foi realizado a partir da diluição  $10^{-2}$ , em triplicata. Após o plaqueamento as placas foram incubadas a 30°C. Os isolados do meio MEMB foram obtidos após 9 dias da inoculação. O isolamento foi realizado através da seleção por visualização morfológica das colônias, sendo isoladas colônias de todas as cores, a exceção das azuis (colônias sem capacidade de degradação do 2,4-D pré-identificadas através do

uso do meio diferencial MEMB), utilizando meio Luria Bertani (LB) enriquecido com 2,4-D (Sigma-Aldrich com pureza > 98%) a 500 mg.L<sup>-1</sup>.

Para verificação que os isolados obtidos podem crescer em meio exclusivamente com 2,4-D, estes foram repicados para meio mineral líquido contendo 2,4-D como única fonte de carbono (FÜSCHSLIN *et al.*, 2003) e incubados a 30°C durante 15 dias sob agitação de 180 rpm. Os isolados obtidos foram agrupados com base nas características morfológicas e de coloração da colônia no meio MEMB e em meio LB. Também foram consideradas a coloração de Gram e a morfologia das células. A coloração de Gram foi realizada como descrito em MADIGAN *et al.* (2004b) e a visualização da morfologia das células realizada por microscopia de campo claro (MADIGAN *et al.*, 2004b). A identificação dos isolados foi feita através dos testes bioquímicos e da amplificação do fragmento do gene *16S rDNA* (Subunidade do 16S do ácido desoxirribonucléico ribossomal). O esquema da metodologia utilizada é apresentado na Figura 1.

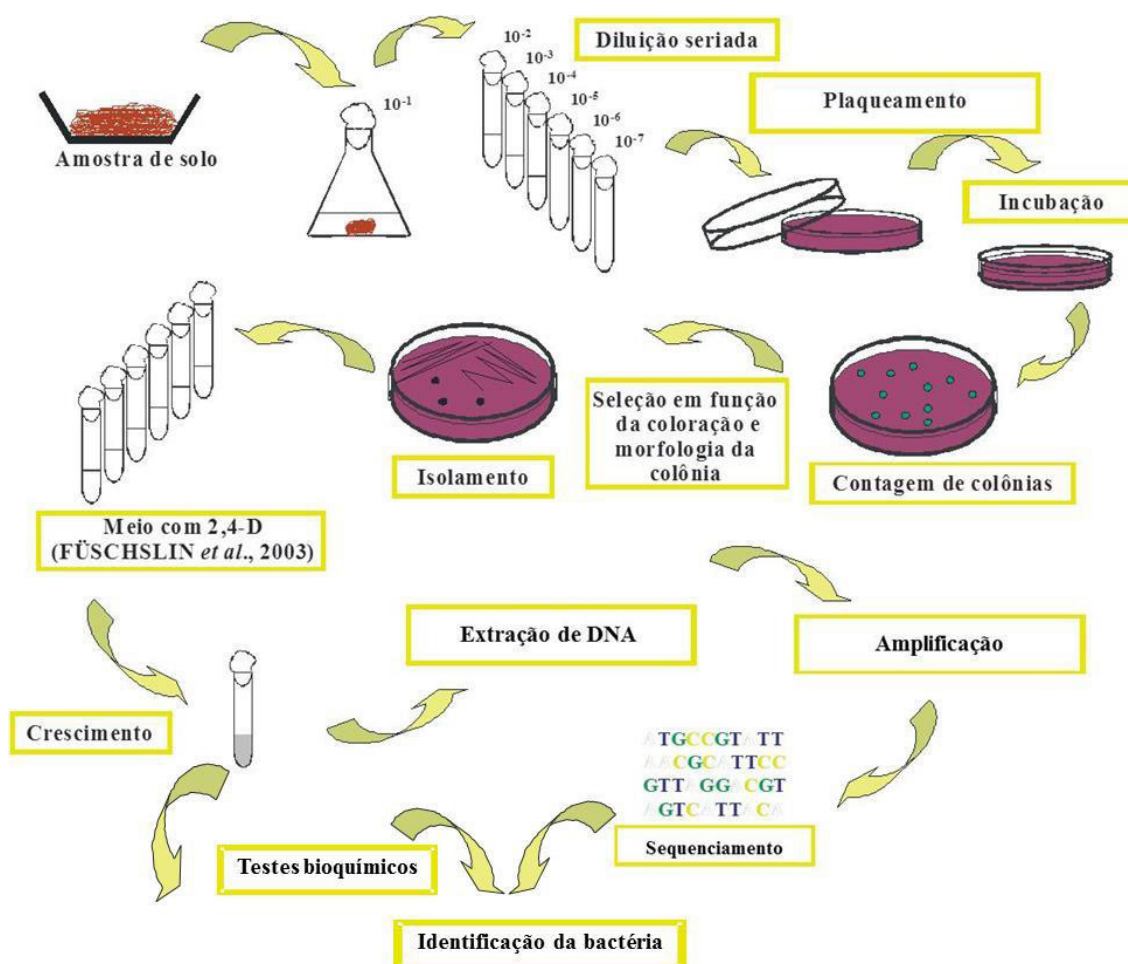


Figura 1. Esquema da metodologia para obtenção e identificação das bactérias isoladas com capacidade de degradação do herbicida 2,4-D.

## 2.2 Potencial de degradação do herbicida 2,4-d pelas bactérias isoladas do solo

Os isolados bacterianos foram repicados para tubos de ensaio com meio de cultura mineral usando o 2,4-D como a única fonte de carbono (FÜSCHSLIN *et al.*, 2003). O experimento foi realizado em triplicata. Foi utilizado o próprio meio de cultivo

sem o inóculo como controle. Os tubos inoculados foram incubados por 21 dias a 30°C. Após este período foi realizada a leitura dos tubos para verificação do crescimento dos isolados por turbidimetria a 550 nm e coletado o material para a análise cromatográfica. A coleta do material para análise cromatográfica foi através da filtração do meio de cultura empregando membrana durapore 0,22 µm de porosidade. A amostra filtrada foi conservada a -20°C até o momento da injeção.

O cromatógrafo utilizado na quantificação do 2,4-D foi o da marca Merck equipado com detector *Diode Array*. A aquisição e tratamento dos dados foi feita com o *software EZchrom* (Merck). A corrida cromatográfica foi realizada utilizando o método selecionado por Sbano *et al.* (2013).

Foram injetados o 2,4-D e possíveis derivados da degradação deste: 2,4-diclorofenol, 2-clorofenol, 4-clorofenol, 4-cloro-2-metilfenol e 2-metilfenol, todos da Sigma-Aldrich com pureza > 98%.

### 2.3 Testes bioquímicos para identificação bacteriana

Foi utilizado o equipamento VITEK® 2 Compact para identificar os microrganismos por meio de testes, que medem a utilização da fonte de carbono, resistência do microrganismo e a atividade enzimática. A metodologia empregada é baseada nas características dos dados e no conhecimento sobre o microrganismo e reações analisadas com base no banco de dados que este equipamento possui. Caso não seja reconhecido um padrão único de identificação, é fornecida uma lista de possíveis microrganismos ou a estirpe é determinada não identificável pela base de dados. Para identificação das amostras pelo VITEK® 2 Compact foram utilizados os protocolos do fabricante para uso do sistema.

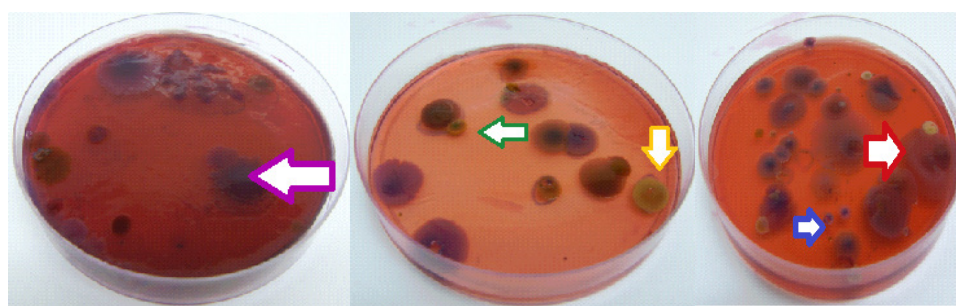
### 2.4 Identificação bacteriana por análise de fragmento do 16s rDNA

A extração do DNA do isolado foi realizada seguindo o protocolo de Berbert e colaboradores (2018). O isolado foi identificado através da amplificação e sequenciamento de fragmento do 16S rDNA gerado utilizando os iniciadores 926F (5'-AAA CTC AAA KGA ATT GAC GG – 3') (LANE, 1991) e 1378R (5' GCG TGT GTA CAA GAC CC 3') (HEUER & SMALLA, 1997) nas condições descritas por Direito (2009). O Programa de amplificação consistiu em uma etapa inicial de desnaturação a 98°C durante 5min, seguido por 30 ciclos com desnaturação a 95°C por 1min, anelamento a 55°C por 40s e extensão a 72°C por 2min, com extensão final a 72°C por 10min. O produto da amplificação foi enviado à empresa comercial que realizou a purificação e o sequenciamento capilar bidirecional. A sequência de nucleotídeos obtida foi analisada através do *software* BLAST, utilizando a ferramenta BLASTn.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Bactérias isoladas do solo com capacidade de degradação do 2,4-d

O isolamento das bactérias oriundas das amostras de solo da rizosfera de chicória foi realizado com o meio MEMB. O MEMB é uma variação do meio EMB empregado na microbiologia para identificação de bactérias fermentadoras de lactose (DIREITO, 2009). No MEMB, as colônias de microrganismos degradadores de 2,4-D possuem coloração avermelhada e as não degradadoras a coloração azulada (DIREITO, 2009). Como relatado por Direito (2009), além das colônias de coloração azulada e avermelha, houve o crescimento de colônias com coloração verde e amarela, o que também foi observado no isolamento de bactérias de amostra de solo da rizosfera de chicória (Figura 2). A visualização das colônias que degradam o 2,4-D pela alteração da cor da colônia é induzida pela acidificação do meio (CHONG, 2005; DIREITO, 2009). Como as colônias verdes e amarelas não são nem avermelhadas (degradadoras do 2,4-D) nem azuladas (não degradadoras do 2,4D), estas também foram selecionadas. Seguindo este critério, foram isoladas 45 bactérias, compreendendo microrganismos Gram positivos e Gram negativos.



**Figura 2.** Fotos das placas com meio MEMB para isolamento de bactérias degradadoras do herbicida 2,4-D através da coloração das colônias. As setas identificam em: A, colônias com coloração roxa; B, colônias com coloração verde (seta verde) e amarela (seta amarela); C, colônias com coloração azul (seta azul) e vermelha (seta vermelha).

#### 3.2 Potencial de degradação do herbicida 2,4-d pelas bactérias isoladas do solo

A capacidade de degradação do 2,4-D pelas bactérias isoladas foi analisada pelo perfil cromatográfico obtido após crescimento bacteriano em meio mineral contendo 2,4-D como única fonte de carbono. Foi realizada a sobreposição dos perfis cromatográficos gerados pelo crescimento dos isolados bacterianos com o perfil cromatográfico do 2,4-D com os seus derivados 4-Clorofenol; 2,4-Diclorofenol, 2-Clorofenol, 2-Metilfenol e 4-Cloro-2-Metilfenol (Figura 3). Dentre os isolados estudados, teve destaque o identificado pelo código CH05 pelo perfil gerado demonstrar uma molécula com tempo de retenção (Figura 4) e espectro distintos das estudadas (dados não apresentados). Esta estirpe foi submetida ao processo para identificação taxonômica.



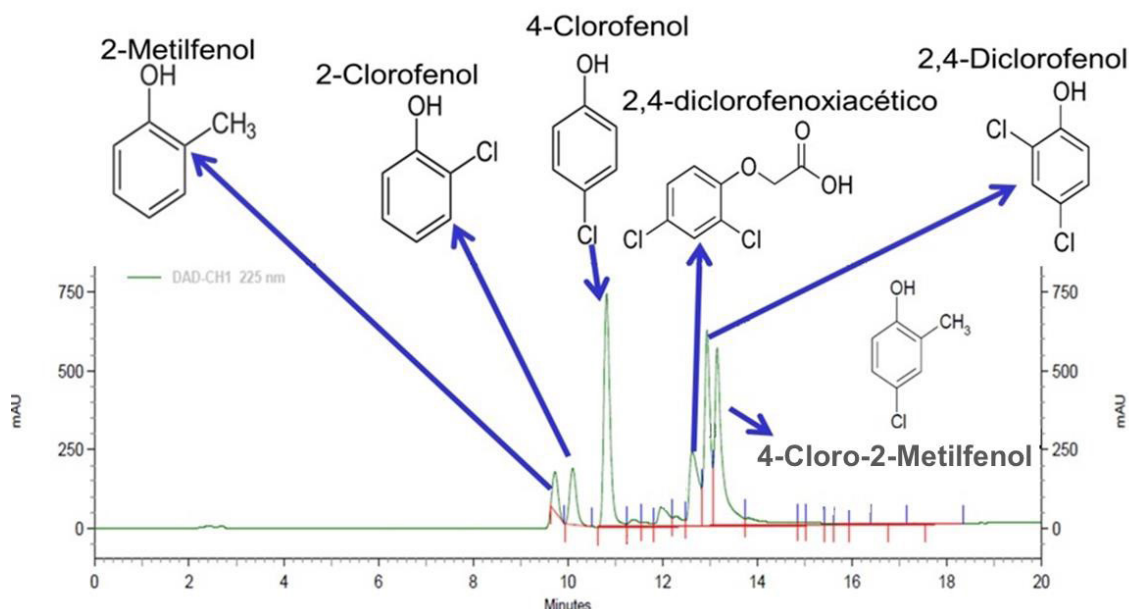


Figura 3. Perfil cromatográfico do 2,4-D com seus derivados 4-Clorofenol; 2,4-Diclorofenol, 2-Clorofenol, 2-Metilfenol e 4-Cloro-2-Metilfenol. TR do 4-Clorofenol: 10,820 min; TR do 2,4-Diclorofenol: 12,940 min; TR do 2-Clorofenol: 10,107 min; TR do 2-Metilfenol: 9,727 min; e, TR do 4-Cloro-2-Metilfenol: 13,153 min.

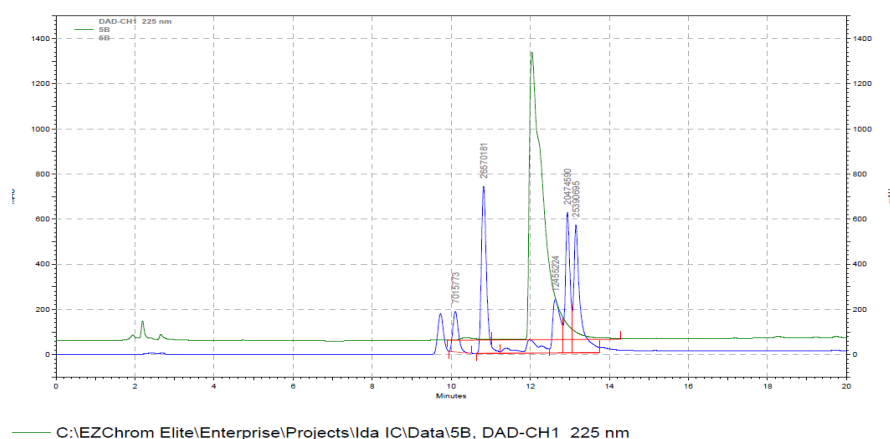


Figura 4. Perfil cromatográfico do isolado bacteriano identificado como CH05 obtido após o cultivo em meio mineral com 2,4-D (linha verde) sobreposto ao perfil cromatográfico do 2,4-D com seus derivados 4-Clorofenol; 2,4-Diclorofenol, 2-Clorofenol, 2-Metilfenol e 4-Cloro-2-Metilfenol (linha azul). Linha verde: Tempo de retenção (TR) do pico gerado após crescimento da bactéria: 12,047 min; Linha azul: TR do 4-Clorofenol: 10,820 min; TR do 2,4-Diclorofenol: 12,940 min; TR do 2-Clorofenol: 10,107 min; TR do 2-Metilfenol: 9,727 min; e, TR do 4-Cloro-2-Metilfenol: 13,153 min.

### 3.3 Identificação taxonômica do isolado bacteriano

Após a caracterização morfo-tintorial do isolado, a bactéria CH05 foi submetida aos testes bioquímicos pelo sistema VITEK® 2 Compact. O resultado da análise bioquímica obtido por este sistema apresentou 99% de probabilidade para a bactéria *Delftia acidovorans*. Este percentual indica que todos os testes bioquímicos analisados no equipamento atenderam ao esperado do banco de dados do VITEK® 2 Compact.

Em seus estudos, Hoffmann e colaboradores (2003) observaram que a bactéria *Delftia acidovorans* foi capaz de mineralizar o herbicida 2,4-D. Segundo os autores, essa espécie microbiana apresenta dois conjuntos de genes que participam da rota



de degradação descrita na literatura como presente na estirpe *Ralstonia eutropha* JMP134, bacteriana modelo no estudo de degradação do herbicida 2,4-D.

O resultado do sequenciamento corrobora com a identificação realizada pelo sistema VITEK® 2 Compact até o nível de gênero, pois apresentou 100% de cobertura e identidade com *Delftia sp.*.

## 4 | CONCLUSÕES

A metodologia empregada neste estudo é adequada para o isolamento e identificação taxonômica de bactérias com a capacidade de degradação do herbicida 2,4-D de amostras do solo. A estirpe isolada do gênero *Delftia* com capacidade de biotransformação do herbicida 2,4-D deve ser investigada tanto em nível de genoma quanto em experimentos laboratoriais para verificação da sua capacidade de uso em biorremediação.

## 5 | AGRADECIMENTOS

Às agências de fomento FAPERJ e CNPq pelo apoio ao desenvolvimento deste estudo.

## REFERENCIAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Sistema de Informações sobre Agrotóxicos (SIA)**. Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/agrosia/asp/default.asp>> Acesso em: 13 Fev. 2004.

ARMAS, E. D.; MONTEIRO, R. T. R. **Uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar na bacia do rio Corumbataí e o risco de poluição hídrica**. Química Nova, v. 28, n. 6, p. 975 - 982, 2005.

ATTERBY, H.; SMITH, N.; CHAUDHRY, Q. E STEAD, D. **Exploiting microbes and plants to clean up pesticide contaminated environments**. Journal Pesticide Outlook, p. 9 – 13, 2002.

BERBERT, L.C.; SUCCAR, J.B.; FLORES, V.R.; DIREITO, I.C.N. **Protocolo para extração de DNA para utilização em aulas práticas no ensino superior**. Acta Scientiae et Technicae, v. 6, n. 1, 2018.

BRASIL. **Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989**. Diário Oficial da União. Poder Executivo. Brasília, DF: Congresso Nacional, 1989.

CASSAL, V. B.; AZEVEDO, L. F.; FERREIRA, R. P.; SILVA, D. G.; SIMÃO, R. S. **Agrotóxicos: uma revisão de suas consequências para a saúde pública**. Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental – REGET, v. 18, n. 1, p. 437 - 445, 2014.

CASTRO, J. S. M.; CONFALONIERI, U. **Uso de agrotóxicos no Município de Cachoeiras de Macacú (RJ)**. Ciência e Saúde Coletiva, v. 10, n. 2, p. 473 -482, 2005.

CHONG, N. M. **Development of a tool for measuring the degradation capacity of microorganisms for a xenobiotic**. Enzyme and Microbial Technology, v. 37, p. 467 – 471, 2005.

CISCATO, C. H. P. **Resíduos de praguicidas em amostras de ovo comercializadas na cidade de São Paulo**. 2008. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R. **Principais aspectos da poluição de rios brasileiros por pesticidas**. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v. 18, n. 12, p. 1296 - 1301, 2014.

DIREITO, I. C. N. **Bioprospecção e interações de populações bacterianas degradadoras do herbicida 2,4-D em solos agrícolas**. 2009. 190f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Biotecnologia Vegetal - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

EMBRAPA. **Visão 2030: O Futuro da Agricultura Brasileira**. 2018. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/10180/9543845/Vis%C3%A3o+2030+-+o+futuro+da+agricultura+brasileira/2a9a0f27-0ead-991a-8cbf-af8e89d62829>>. Acesso em: 10 Abr. 2019.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Pesticides Use**. Disponível em: <[www.fao.org/faostat/en/#data/RP/visualize](http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP/visualize)>. Acesso em: 10 Abr. 2019.

FERREIRA, J. V. R.; PECKLE, B. A.; SILVA, A. S.; GOMES, A. S.; SANTANA, V. M.; DIREITO, I. C. N. **Pesticidas aplicados na lavoura e o risco à saúde pública: uma revisão da literatura**. Cadernos UniFOA, v. 9, n. 24, p. 87 - 103, 2014.

FLORES, H. E.; VIVANCO, J. M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. **'Radicle' biochemistry: the biology of root-specific metabolism**. Trends in Plant Science, v. 4, n. 6, p. 220 - 226, 1999.

FÜSCHSLIN, H. P.; RÜEGG, I.; VAN DER MEER, J. R.; EGLI, T. **Effect of integration of a GFP reporter gene on fitness of *Ralstonia eutropha* during growth with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid**. Environmental Microbiology, v. 5, p. 878 - 887, 2003.

HEUER, H.; SMALLA, K. **Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities**. In: VAN ELSAS, J. D., TREVORS, J. T.; WELLINGTON, E. M. H. Modern soil microbiology. New York: Marcel Dekker. p. 353 - 373, 1997.

HOFFMANN, D.; KLEINSTEUBER, S.; MULLER, R. H.; BABEL, W. **A transposon encoding the complete 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation pathway in the alkalitolerant strain *Delftia acidovorans* P4a**. Microbiology, v. 149, p. 2545 - 2556, 2003.

IBGE. **Indicadores de desenvolvimento sustentável: Brasil 2015**. Rio de Janeiro: IBGE, 2015. 352p. – (Estudos e pesquisas. Informação geográfica; n. 10)

INCA. **Agrotóxicos**. 2018. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/exposicao-no-trabalho-e-no-ambiente/agrotoxicos>>. Acesso em: 10 Abr. 2019.

LANE, D. J. **16s/23s rRNA sequencing**. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. New York: Wiley, p. 115 -175, 1991.

LUNDBERG, I.; HOGBERG, M.; MICHEISEN, H.; NISSE, G. **Effects of long term organophosphate exposure on neurological symptoms, vibration sense and tremor among South African farmer workers**. Occupational and Environmental Medicine, v. 3, p. 343 – 350, 1997.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Habitats microbianos, ciclos de nutrientes e interações com plantas e animais**. In: \_\_\_\_\_. Microbiologia de Brock. Trad. C. M. Kyan. 10 ed. United States of America: Prentice Hall, 2004a. (Tradução de: Brock biology of microorganisms) Cap. 20. CD-ROM.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Estrutura/Função celular**. In: \_\_\_\_\_. Microbiologia de Brock. Trad. C. M. Kyan. 10 ed. United States of America: Prentice Hall, 2004b. (Tradução de: Brock biology of microorganisms) Cap. 4. p. 52 - 94.

OLIVEIRA-SILVA, J. J.; MEYER A. O. **Sistema de notificação das intoxicações: o fluxograma da joeira**. In: PERES, F.; MOREIRA, J. C. É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente, cap. 14, p. 317 - 326, 2003.

PIUTTI, S.; SEMON, E.; LANDRY, D.; HARTMANN, A.; DOUSSET, S.; LICHTFOUSE, E.; TOPP, E.; SOULAS, G.; MARTIN-LAURENT, F. **Isolation and characterization of *Nocardioides* sp. SP12, an atrazine-degrading bacterial strain possessing the gene trzN from bulk and maize rhizosphere soil**. FEMS Microbiology Letters, v. 221, p. 111 - 117, 2003.

RODRIGUES, N. R.; ANDRIETTA, M. G. S. **Biodegradação do diclosulam por bactérias isoladas de solos cultivados com soja**. Planta Daninha, v. 28, n. 2, p. 393 - 400, 2010.

SBANO, A.; FERREIRA, J. V. R.; PECKLE, B. A.; MACRAE, A.; DIREITO, I. C. N. **Otimização de método cromatográfico para quantificação do herbicida ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D)**. Acta Scientiae et Technicae, v. 1, n. 2, p. 37 - 46, 2013.

SINGER, A. C.; CROWLEY, D. E.; THOMPSON, I. P. **Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation**. TRENDS in Biotechnology, v. 21, n. 3, p. 123 - 130, 2003.

SMALLA, K.; WIELAND, G.; BUCHNER, A.; ZOCK, A.; PARZY, J.; KAISER, S.;

ROSKOT, N.; HEUER, H.; BERG, G. **Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed**. Applied and Environmental Microbiology, v. 67, n. 10, p. 4742 - 4751, 2001.

SUN, H.; XU, J.; YANG, S.; LIU, G.; DAI, S. **Plant uptake of aldicarb from contaminated soil and its enhanced degradation in the rhizosphere**. Chemosphere, v. 54, p. 569-574, 2004.

VEIGA, M. M. **Agrotóxicos: Eficiência econômica e injustiça socioambiental**. Ciência e Saúde Coletiva, v. 12, n. 1, p. 145 - 152, 2007.

## REABILITAÇÃO DE AREAS DEGRADADAS PELA MINERAÇÃO DE QUARTZITO COM INSTALAÇÃO DE USINA SUSTENTAVEL

**Gabriel Silva Gomes**

**RESUMO:** Este estudo faz uma pesquisa sobre o aproveitamento do potencial energético presente em propriedades mineradoras, onde a produção desta energia se deve ao fato da utilização de múltiplas fontes energéticas renováveis, enfatizando no conceito de sustentabilidade e destacando a possibilidade do desenvolvimento da qualidade de vida do trabalhador do campo e do potencial energético nacional, através da elaboração de uma metodologia para o estudo, projeto e implantação de uma usina mista com intuito de auxiliar a matriz energética mais aplicada no Brasil. Conclui-se ao término deste estudo que múltiplas fontes energéticas aplicadas em regiões específicas possuem grande potencial energético, sanando problemas sociais, ambientais e econômicos. Analisando preliminarmente esta pesquisa, adota-se a coleta de informações por meio de referenciais teóricos, com o objetivo de cumprir os critérios e etapas de produção propriamente descritos, objetivando apresentar a eficiência de múltiplas fontes energéticas, dando ênfase à produção de energia limpa e sua importância no desenvolvimento tecnológico contemporâneo. A partir das informações obtidas, identificaram-se os principais aspectos de uma visão integradora, podendo contribuir para o melhor entendimento

dos processos de produção de energia elétrica sem poluição, possibilitando o envolvimento maior e o comprometimento efetivo de todos, seja empresa, profissionais liberais, sociedade e governo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Energia alternativa. Tecnologia. Matriz energética. Energia limpa.

**ABSTRACT:** This study is a survey on the use of the potential energy present on mining industries, where production of this energy is due to the use of multiple renewable energy sources, focusing on the concept of sustainability and highlighting the possibility of developing the workers' field quality of life, and potential national energy through an elaboration of a methodology for the study, design and implementation of a power plant mixed with the intention of assisting more applied energy matrix in Brazil. It was concluded at the end of this study that multiple energy sources applied in specific regions have great potential energy, solving social, environmental and economic problems. Analyzing this preliminary research, we adopt the collection of information through theoretical frameworks in order to fulfill the criteria and production steps properly described, aiming at presenting the efficiency of multiple energy sources, with an emphasis on clean energy production and its importance in contemporary social development. From the

information obtained, we identified the main aspects of an integrated vision and can contribute to a better understanding of the processes of production of electricity without pollution, allowing for greater involvement and the effective commitment of all, such as company, self-employed professional, society and government.

**KEYWORDS:** Alternative energy. Technology. Energy sources. Clean energy.

## 1 | INTRODUÇÃO

A história da humanidade é marcada por processos evolutivos que se sucedem de adversidades encontradas durante determinado período, como por exemplo: o sedentarismo, a invenção de ferramentas, a revolução industrial, agricultura, a era da comunicação, etc. Através da evolução da inteligência humana e do desenvolvimento tecnológico o ser humano tornou-se dependente de energia para realizar tarefas que objetivam o desenvolvimento tecnológico e o melhoramento da qualidade de vida da espécie.

Em tempos modernos a humanidade depara-se com mais um processo evolutivo, que incide na necessidade de desenvolver-se tecnologicamente, socialmente, economicamente e em harmonia com a natureza, partindo para um ideal sustentável.

As primeiras ideias sobre sustentabilidade surgiram em meados de 1979, durante um simpósio em Estocolmo. Em 1987 foi elaborado e publicado o relatório Brundtland, pela Comissão Mundial sobre Meio Ambiente, definindo sustentabilidade como: “O desenvolvimento sustentável é aquele que atende as necessidades do presente sem comprometer a possibilidade de as gerações futuras atenderem as suas próprias necessidades.” (COMISSÃO BRUNDTLAND, 1991, p. 46).

Entretanto o marco definitivo foi em 1992 com a conferência conhecida como RIO 92, realizada no Rio de Janeiro (Brasil) de 3 a 14 de junho de 1992. Durante a conferencia foram produzidos inúmeros tratados e documentos, entre eles, a Agenda 21.

A Agenda 21 é um programa de ações onde contribuíram governos e instituições da sociedade civil de 179 países, que constitui a mais ousada e abrangente tentativa já realizada de promover, em escala planetária, um novo padrão de desenvolvimento, conciliando métodos de proteção ambiental, justiça social e eficiência econômica. (HISTÓRIA..., [2010?], p. 1).

Tendo em vista a necessidade do desenvolvimento sustentável, o projeto busca satisfaze-lo através da ideia de que a natureza proporciona condições de utilização de energia limpa e renovável.

É possível produzir energia elétrica de maneira eficiente e sustentável de forma a cumprir todos os requisitos de normas e padrões adotados pela legislação atual do país em áreas degradadas pela mineração de quartzito.

Segundo a revista National Geographic Brasil, mais de 1,4 bilhão de pessoas no mundo vivem sem acesso à energia, o que diminui seu bem-estar e atrasa seu

desenvolvimento econômico. Nos moldes atuais, a geração de energia emite grande quantidade de gases de efeito estufa.

National Geographic Brasil acrescenta que até 2030 a ONU (Organização das Nações Unidas) deseja universalizar o acesso à energia limpa, dobrar a eficiência energética e dobrar as energias renováveis.

Tendo em vista os fatos apresentados acima justifica-se o projeto de pesquisa.

## 2 | REFERENCIAL TEORICO

### 2.1 Energia Solar

Ciente dos fatores bióticos e abióticos, e analisando também os dados coletados do local, a implementação do projeto tende a ser diferenciada para cada caso particular de aplicação do mesmo, ou seja, cada projeto terá de ser analisado de forma dependente das condições geográficas de cada local.

O projeto é para região sul mineira, será descrito segundo as específicas características locais. Devido a seu posicionamento global o Brasil, encontra-se em sua maioria na zona tropical. À qual é uma região de alto potencial de energia solar.

Uma das formas de aproveitamento da radiação solar é por meio da sua conversão em energia elétrica. Esta conversão se deve à um fenômeno físico, o efeito fotovoltaico, descoberto pelo pesquisador Edmond Becquerel em 1839.

A luz solar é constituída por partículas elementares (fótons), que ao incidir sobre um material semicondutor, excita os elétrons livres da camada de valência desse material.

A quantidade de energia necessária para gerar a transição de um elétron entre as camadas é chamada de *gap* (salto) de energia. À medida que a energia aumenta, o número de elétrons que passam para a camada de condução também aumenta, passando a conduzir mais eletricidade quando exposto a uma diferença de potencial (MACIEL; LOPES; LIMA, 2008).

A diferença de potencial nos fenômenos fotovoltaicos é proporcionada através de um painel solar.

Utilizando-se do silício e introduzindo Ihe em uma de suas metades, átomos de três elétrons e na outra, átomos de cinco elétrons, obtém-se uma junção dos dopantes p e n, chamada de junção pn.

Caso uma junção pn seja exposta a fótons com energia maior que o *gap*, serão gerados pares de elétron-lacuna, com este fato os elétrons serão acelerados criando uma corrente elétrica através da junção.

O funcionamento das células fotovoltaicas é baseado nesse fenômeno elétrico, assim como ilustra a figura abaixo:



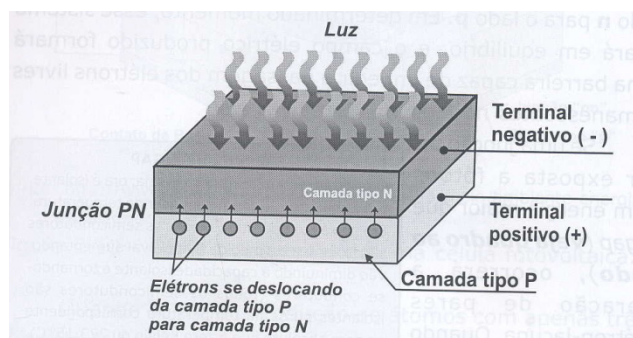


Figura 02 – Funcionamento de um painel solar.

Fonte: (MACIEL; LOPES; LIMA, 2008. p.54).

Assim, basicamente, a transformação da radiação solar em energia elétrica ocorre porque a radiação solar, incidindo em um painel, constituído de material semicondutor, causa diferença de potencial que, por sua vez, gera uma corrente contínua. Essa corrente elétrica poderá ser utilizada para acionar cargas, diretamente, ou poderá ser armazenada em baterias para uso posterior. (MACIEL; LOPES; LIMA, 2008, p. 45).

Maciel, Lopes e Lima (2008) exemplificam que é possível alimentar um pequeno posto de saúde rural, com geladeira, iluminação e radiocomunicação com energia solar.

Maciel, Lopes e Lima (2008) dizem que a ligação entre painéis e células solares pode ser feita de três diferentes maneiras. A ligação em série soma a tensão (diferença de potencial) entre elas, à ligação em paralelo soma as correntes, e a ligação mista soma as correntes e tensões.

Para melhor aproveitamento energético o projeto aconselha a ligação mista entre eles.

O processo de instalação do painel solar inicia-se através de seu posicionamento, para que receba o máximo de sol ao longo do dia. A condição mais eficaz de aproveitamento da energia do sol, a qual se dá por um acompanhamento do painel procurando manter a face perpendicular aos raios solares, mas a automação do projeto o inviabiliza economicamente. Portanto procura-se fazer a sua instalação com ângulo intermediário que proporcione maior aproveitamento da energia, mesmo estando fixo.

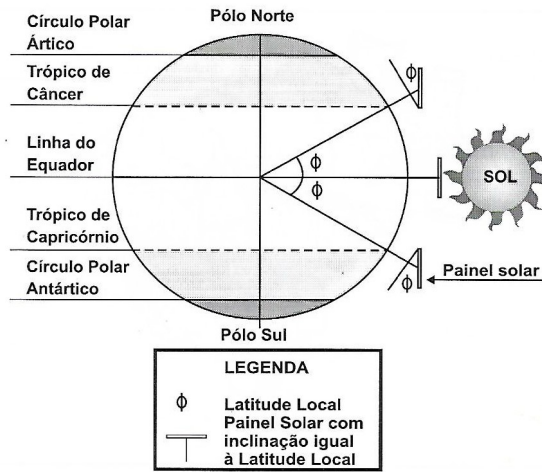


Figura 03 – Ângulo de instalação do painel solar.

Fonte: (MACIEL; LOPES; LIMA, 2008, p. 143).

Analisando por este âmbito, o sistema fica muito mais simples e o aproveitamento não se compromete, pois, as maiores perdas de radiação se darão pela manhã e ao entardecer.

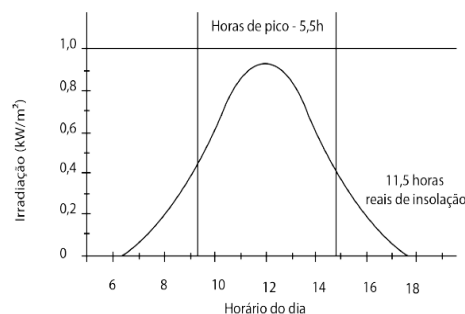


Figura 04: Gráfico da Variação de Irradiação do Dia.

Fonte: SOUZA, 2016.

Os momentos de insolação máxima ocorrem entre 9:20h e 14:40h, durante este período o painel deverá estar perpendicular aos raios do sol, para melhor aproveitamento da energia. Nesse sentido o melhor ângulo de inclinação do painel em relação ao sol é a latitude local, e sua face deverá estar voltada para o hemisfério contrário ao de sua instalação como afirmam Maciel, Lopes e Lima.

A Radiação solar varia durante o dia e tem sua maior intensidade ao meio-dia-solar.

O local onde o painel será instalado deverá ser limpo, de fácil acesso e sem a presença de obstáculos que possam sombrear o painel. Além disso ele deverá ficar o mais próximo possível do local onde as cargas elétricas serão instaladas. O painel poderá ser instalado diretamente no solo ou em telhados. (MACIEL; LOPES; LIMA, 2008, p.144).

O efeito fotovoltaico, segundo Edmond Becquerel em 1839, consiste no aparecimento de uma diferença de potencial nos extremos de um semicondutor, quando esse absorve a luz visível. É o objeto de estudo deste livreto e a forma de captação de energia solar mais promissora.

São incontestáveis as vantagens da energia solar fotovoltaica: A matéria prima é inesgotável. Não há emissão de poluentes durante a geração da eletricidade. Os sistemas podem ser instalados em todo o globo.

Infelizmente a energia solar fotovoltaica tem suas deficiências: A densidade é pequena, se comparado às fontes fósseis. A energia solar disponível em uma localidade varia sazonalmente. Os equipamentos de captação e conversão requerem investimentos financeiros iniciais elevados do que os convencionais.

O baixo luxo de potencial solar requer grande área captadora, para obter maiores potências. A variabilidade da *Irradiação Solar* implica no uso de sistemas de armazenamento, que são, em geral, pouco eficientes. Já o alto investimento inicial, leva a considerar a viabilidade econômica de um projeto, tendo em conta sua vida útil e todas as vantagens da utilização dessa forma de energia.

## 2.2 Energia Eólica

A atmosfera local tem influência sobre a incidência de raios luminosos na superfície terrestre, assim como afirma Pretor-Pinney (2008) “[...] as partículas microscópicas que formam nossa atmosfera – todas as moléculas de oxigênio e nitrogênio e partículas de pó, sal e fuligem – funcionam como obstáculos às ondas da luz que chegam à Terra proveniente do Sol.”.



Figura 09 – Ondas de luz entre as partículas da atmosfera.

Fonte: (PRETOR-PINNEY, 2008, p. 145).

Constatando-se o déficit de eficiência do sistema solar, podendo chegar a 20% da produção de energia em dias nublados como afirmam Maciel, Lopes e Lima (2008). O projeto propõe a adição de aerogeradores para suprir a perda energética.

Fazendo conjectura de que a presença de nuvens e ventos é concomitante, tendo em vista que ambos são formados pelo aquecimento desuniforme da atmosfera (massas de ar), seguindo das afirmações de Sá e Lopes (2001) sobre o processo

de formação dos ventos, e Prettor-Pinney (2008) sobre o processo de formação das nuvens.

Ciente de que o processo de formação das nuvens é derivado do calor emitido pelo sol, e diferencia-se do processo de formação dos ventos através de condicionantes específicas, tais como a partícula motriz para condensação das massas de ar em nuvem, segundo Prettor-Pinney (2008).

A energia eólica provém da energia solar, uma vez que os ventos são originados como decorrência do aquecimento desuniforme da atmosfera, pela radiação solar. Essa desuniformidade no aquecimento da atmosfera é causado, principalmente, pela orientação dos raios solares e pelos movimentos do planeta. Uma estimativa de energia total disponível dos ventos ao redor do planeta pode ser feita a partir da hipótese de que, aproximadamente, 2% da energia solar absorvida pela Terra é convertida em energia de movimento dos ventos. Esse percentual, embora pareça pequeno, representa centenas de vezes a potência anual instalada nas centrais elétricas do mundo. (SÁ; LOPES, 2001, p. 40).

Sá e Lopes (2001) afirmam que as regiões tropicais recebem radiação solar perpendicularmente são mais aquecidas que os polos terrestres. O ar quente das baixas altitudes das regiões tropicais tende a subir, dando lugar a uma massa de ar frio proveniente de regiões polares. É esse deslocamento que determina a formação dos ventos.

Os ventos se devem a transformação de energia solar em energia eólica, devido à variação da irradiação solar sobre regiões do planeta, provocando aquecimento diferenciado das massas de ar que compõem a atmosfera terrestre, gerando correntes de convecção que circulam na atmosfera. (RIBEIRO, 2012, p. 2).

“Os ventos que sopram em escala global e aqueles que se manifestam em pequena escala são influenciados por diferentes aspectos, entre os quais se destacam a altura, a rugosidade, os obstáculos e o relevo.” (SÁ; LOPES, 2001, p. 74).

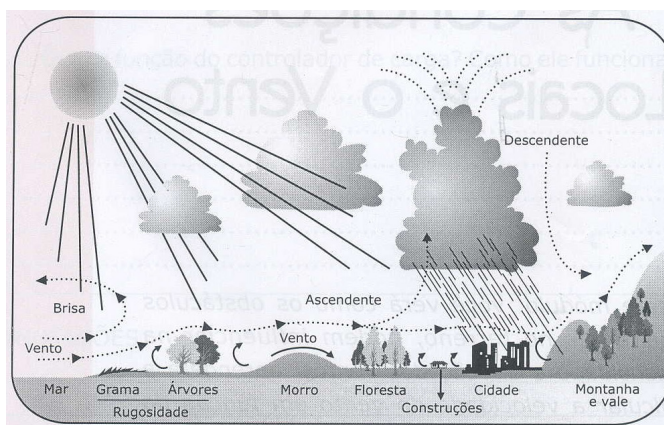


Figura 10 – Perfil dos ventos sobre a influência de características da superfície.

Fonte: (SÁ; LOPES, 2001, p. 74).

Quando se analisa o perfil dos ventos, desde a superfície até uma determinada altura, percebe-se que a medida em que se afastam do solo alcançam maiores

velocidades e se tornam mais uniformes.

“A energia eólica é a energia cinética do ar em movimento, o vento. O vento varia constantemente, tanto na velocidade de escoamento quanto na direção do seu deslocamento.” (RIBEIRO, 2012, p.08).

A determinação pode ser dada observando um fluxo de ar, movendo-se à velocidade  $v$ , perpendicular à seção transversal de um cilindro imaginário.

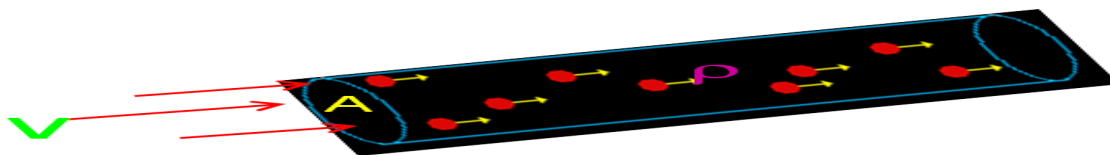


Figura 12 – Fluxo de ar perpendicular a uma seção transversal, se movendo a uma velocidade  $v$ .

Fonte: (RIBEIRO, 2012, p.08).

A transformação da energia eólica em energia elétrica se dá através do uso de aereogeneradores, os quais são capazes de converter energia mecânica do movimento dos ventos em energia elétrica.

Os aereogeneradores são compostos por: rotor eólico, sistema de transmissão, gerador eólico, mecanismo de controle, elementos de sustentação, e os demais acessórios.

Os rotores eólicos normalmente utilizados em sistemas para geração de eletricidade, são comumente constituídos por três pás espaçadas e defasadas em  $120^\circ$ , de forma a obterem o máximo desempenho aerodinâmico, como afirmam Sá e Lopes (2001).

### 2.3 Áreas degradadas

A degradação de uma área está associada à alteração de sua estrutura e a perda de nutrientes do solo decorrentes a alagamento, erosões hídricas e eólicas, salinização, escoamento superficial e compactação dos solos. As principais causas da degradação seriam o desmatamento e o uso insustentável das terras. O uso dos conceitos “degradação” e recuperação variam em meios aos diversos conhecimentos científicos e atividades em que são adotados (CARVALHO, 2011).

“Reabilitação: conjunto de procedimentos através dos quais se propicia o retorno da função produtiva da área ou dos processos naturais visando adequação ao uso futuro” (ABNT-NBR 13030, 2016, p.2).

Para Guimarães (2012) uso futuro tem como definição: que da área afetada pelo empreendimento uso futuro são soluções estratégicas de usos viáveis dos recursos naturais visando a vocação natural da terra, o aproveitamento sustentável, proteção da qualidade do meio ambiente, as tendências socioeconômicas sob o ponto de vista ambiental, social, econômico, técnico e de engenharia.



“A reabilitação parece ser a resposta mais próxima da realidade porque está ligada à ideia de uso e ocupação do solo ou a uma relativa produtividade predefinida de acordo com um projeto de reutilização do local minerado como: lazer, residencial, industrial entre outros” (ELIANE, P.39).

A autorização do uso de recursos naturais é concedida através do procedimento de licenciamento ambiental. O licenciamento ambiental tem como principais normas legais a Lei da Política Nacional do Meio Ambiente (art 9º, inciso IV) (BRASIL 1981); a resolução CONAMA nº001 e nº 237, os quais estabelecem o Estudo de Impacto Ambiental (EIA) e o Relatório de Impacto Ambiental (RIMA), no processo de retirada do licenciamento ambiental vigente entre diversas outras autuações.

Conforme declara Matos e Martins (2006) por serem complexas e delicadas, as intervenções nas áreas mineiras durante a sua fase de *post mining* exigem por um lado bom senso e equilíbrio na adoção das técnicas de remediação e, um excelente conhecimento de cada sítio mineiro a nível geológico, mineiro, metalogenético, geoquímico e ecológico. O investimento no saber destas áreas permitirá a definição de melhores políticas de proteção ambiental. A monitorização e manutenção das áreas mineiras recuperadas deverão ser devidamente asseguradas pelo Estado.

Matos e Martins (2006) afirmam que através da parceria entre organizações estatais, administração local, ONG's, tem sido possível criar projetos de I&D com impactos significativos a nível regional. Algumas minas como Rio Tinto, Tharsis, Aljustrel, S. Domingos, Lousal e Caveira em Portugal apresentam galerias em bom estado de conservação, que permitem a observação e estudo das mineralizações e suas intempéries, merecendo o grau de monumento geológico. Alguns centros mineiros contam já com museus/parques de referência como as minas de Rio Tinto, Lousal e Cova dos Mouros.

“As opções de ocupação dos espaços afectos a pedreiras são infindáveis, ou quase. Desde aterros sanitários, a campos de golfe, as opções são variadas e pode trazer benefícios econômicos, ambientais e sociais importantes” (BASTOS e SILVA).



Figura 22 – Estádio do Braga Futebol Clube. Portugal.

Fonte: BASTOS e SILVA. 20170.



A Norte Fluminense, em 2011 inaugurou uma usina solar fotovoltaica composta por 1800 placas, com dois módulos metálicos instalados sobre uma usina termoelétrica. (NATIONAL GEOGRAPHIC. 2012.).

A AES Eletropaulo investiu 24 milhões de reais na construção do estádio do Esporte Clube Corinthians Paulista na cidade de São Paulo para transformar o mesmo em uma pequena usina solar. O mesmo acontecerá com o Castelão, em Fortaleza, e o Mineirão em Belo Horizonte. (EXAME, 2013).

## 2.4 Legislação Pertinente

Este trabalho segue fundamentalmente a Lei 6.889 do código de Política Nacional do Meio Ambiente e todos seus incisivos e parágrafos.

É de vital importância o seguimento da instrução normativa nº 4 de 13 de Abril de 2011. A mesma estabelece exigências mínimas e norteia a elaboração de Projetos de Recuperação de Áreas Degradadas. (IBRACOQUE, 2008)

O Decreto de lei nº 227 de 28 de Fevereiro de 1967 as permissões, órgãos e métodos e necessários para obtenção de licenciamento ambiental (BRASIL, 1967).

A lei 7.805/89 determina que aquele responsável por explorar os recursos minerais causando danos é obrigado a repará-los. (BRASIL, 1988).

A solução técnica para os danos e exploração dos recursos determinada pelo texto constitucional importará na aceitação da proposta apresentada pelo minerador de acordo com o tipo de mineração (LEMOS, 2015).

O empreendedor tem responsabilidade de apresentar a solução com medidas tecnológicas eficientes de reabilitação, devidamente reconhecidas em literatura científica e atendendo as exigências de qualidade ambiental, concebendo e desenvolvendo soluções para alcançar tal empreendimento. (LEMOS, 2015).

Tais soluções podem ser diversas, mas em geral são obras de engenharia. (LEMOS 2015).

O decreto lei n.º 1.413, de 14 de agosto de 1975 dispõe sobre o controle da poluição do meio ambiente provocada por atividades industriais. (IBRACOQUE, 2008).

A lei nº 7.772 que dispõe sobre as medidas condicionantes da melhoria do meio ambiente de Minas Gerais. (BRASIL, 1980).

A lei n.º 4.771, de 15 de Setembro de 1965, institui o novo código florestal destacando-se os artigos 1º, 2º, 3º, 10º, 26º. (IBRACOQUE, 2008).

A Deliberação Normativa nº 104 avalia sobre a proteção, conservação e melhoria do meio ambiente no estado de Minas Gerais. (COPAM, 2006).

A lei nº 9.314/96 que institui a separação de pesquisa e lavra do minério através de autorização e concessão respectivamente (LEMOS, 2015).

O decreto n.º 76.389 de outubro de 1975 dispõe sobre as medidas de prevenção e controle da poluição industrial de que trata o Decreto Lei N.º. 1413. (IBRACOQUE, 2008)

A portaria n.º 053, de 01 de março de 1979, estabelece normas aos projetos específicos de tratamento e disposição final de resíduos sólidos, bem como a fiscalização de sua implantação. (IBRACOQUE, 2008)

A lei n.º 6.803 de 02 de julho de 1980 dispõe sobre as diretrizes básicas para o zoneamento industrial nas áreas críticas de poluição. (IBRACOQUE, 2008)

A lei n.º 5.793 de 15 de outubro de 1980 dispõe sobre a proteção e melhoria da qualidade ambiental e dá outras providências. (IBRACOQUE, 2008)

A lei n.º 6.938 de 31 de agosto de 1981 dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, seus fins e mecanismos de formulação e aplicação. (IBRACOQUE, 2008)

O decreto n.º 97.632, de 10 de Abril de 1989, dispõe sobre a regulamentação do Artigo 2º, Inciso VIII, da lei n.º 6.938, de 31 de Agosto de 1981, e dá outras providências, Art. 1º - Os empreendimentos que se destinam à exploração de recursos minerais deverão, quando da apresentação do Estudo de Impacto Ambiental - EIA e do Relatório de Impacto Ambiental - RIMA, submeter à aprovação do órgão ambiental competente um Plano de Recuperação de Área Degradada. (IBRACOQUE, 2008; LEMOS, 2015).

A lei n.º 9.605, de fevereiro de 1998 e seu decreto regulamentador 3.179, de setembro de 1999, estabelece medidas penais em proteção ao meio ambiente. É a lei de crimes ambientais. (SILVA, 1999).

A lei n.º 9.985 de 18 de julho de 2000 estabelece o sistema nacional de unidades de conservação, definindo os diversos tipos de áreas protegidas. (IBRACOQUE, 2008)

A Constituição Federal de 1988 (art. 176) que estipula a possibilidade de pesquisa e lavra de recursos minerais mediante a concessão da união. (IBRACOQUE, 2008; LEMOS, 2015).

A resolução do CONAMA 01/86 de 23 de Janeiro de 1986. Definindo a avaliação de impacto ambiental. (IBRACOQUE, 2008; LEMOS, 2015).

A resolução do CONAMA 01/90 de 08 de Março de 1990. Sobre a emissão de ruídos do empreendimento. (IBRACOQUE, 2008; LEMOS, 2015).

A resolução do CONAMA 03/90 de 28 de Junho de 1990. Avaliando os padrões de qualidade do ar. (IBRACOQUE, 2008; LEMOS, 2015).

A resolução do CONAMA 09/90 de 06 de Dezembro de 1990. Implicando no licenciamento ambiental de extração mineral. (IBRACOQUE, 2008; LEMOS, 2015).

A resolução do CONAMA 02/96 de 18 de Abril de 1996 sobre a compensação por danos ambientais. (IBRACOQUE, 2008; LEMOS, 2015).

Resolução 237/97 de 19 de Dezembro de 1997, a qual define os critérios de licenciamento ambiental. (IBRACOQUE, 2008; LEMOS, 2015).

Resolução 357/05 de 17 de Março de 2005. Padrões e uso das águas. (IBRACOQUE, 2008; LEMOS, 2015).

É de suma importância destacar, dentre outras, a norma NBR 10.151 que trata dos ruídos. (IBRACOQUE, 2008).

NBR 10.004 e 10.006 que dispõem sobre classificação e solubilização de resíduos

sólidos, respectivamente. (IBRACOQUE, 2008).

NBR 9.547 sobre material particulado. (IBRACOQUE, 2008).

NBR 13029 que padroniza a disposição de estéril em pilhas. (ABNT, 2006)

NBR 13.030 que determina a elaboração e apresentação de projetos de reabilitação de áreas degradadas pela mineração. (IBRACOQUE, 2008; LEMOS, 2015).

Deve-se observar também o disposto nas Normas Reguladoras de Mineração, principalmente a NRM-21, que dispõe sobre a reabilitação de áreas pesquisadas, mineradas e impactadas. (IBRACOQUE, 2008).

## 2.5 Custos e Mercado

Para uma avaliação mais realista da possibilidade de instalação da usina, segue uma análise de custo e tendências mercadológicas para o futuro.

O Brasil necessita aumentar sua oferta de energia, entretanto esta ação estratégica deve ser integrada, de forma a desenvolver a sociedade nas áreas econômica, social e ambiental. As fontes renováveis de energia promovem o desenvolvimento sustentável, porém as vantagens de sua implantação de forma distribuída são prejudicadas pela mentalidade arraigada de fornecer energia de forma centralizada, que afeta inclusive a energia solar, a qual é naturalmente dispersa. (SHAYANI, OLIVEIRA, CAMARGO, 2006. p. 1.).

Em uma análise feita superficialmente, as energias renováveis, apresentam-se com preço final da energia mais elevado do que o sistema convencional centralizado de fornecimento de eletricidade. Entretanto a simplicidade com que esta energia é gerada promove uma redução de custos quando todos os processos necessários são contabilizados.

Os recursos derivados e outras fontes não renováveis precisam, serem extraídos dos locais onde estão concentrados, transportados, processamento industrial até serem movidos novamente para as usinas e após a geração de eletricidade, esta deve ser transmitida através de linhas de alta tensão para o consumidor. Muitas dessas tecnologias produzem resíduos e os processos agregam valor a matéria prima. A utilização de máquinas rotativas, tais como turbina e gerador, necessitam de uma rotina de manutenção mais complexa, devido ao desgaste natural das peças móveis, além de gerar poluição sonora durante o seu funcionamento. (SHAYANI, OLIVEIRA, CAMARGO. 2006.).

Tipo de Geração	Custo de implantação ANEEL [US\$/W]	Custo de implantação CESP/IMT [US\$/W]
Termelétrica a Diesel	0,40 à 0,50	0,35 à 0,50
Termelétrica a gás	0,40 à 0,65	0,35 à 0,50
Termelétrica a vapor	0,80 à 1,00	-
Termelétrica ciclo combinado	0,80 à 1,00	-
Pequenas centrais hidrelétricas	1,00	-
Geração eólica	1,20 à 1,50	1,00
Células fotovoltaicas	-	5,00 à 10,00

Tabela 05 – Custos da potencia instalada por fonte de energia.

Adaptado de: Comparação de Custo entre Energia Solar Fotovoltaica e Fontes Convencionais. 2006

Através da análise dos custos da tabela acima pode-se concluir que os dados apresentados pela tabela acima são discutíveis onde: o preço das tecnologias derivadas de combustíveis fósseis está equivocado pois o custo exposto é o custo de instalação do maquinário e não o custo total para gerar 1 Watt de energia. Para correção do mesmo é necessário a inclusão do valor do combustível na hora da queima e de todos os processos que agregam valor no mesmo. Desta forma, possivelmente ficará claro que a diferença entre a solar pelas mesmas não será tão exorbitante, facilitando os meios de instalação de outras energias renováveis. (SHAYANI, OLIVEIRA, CAMARGO. 2006.).

Um relevante aspecto a ser considerado é que os sistemas eólicos e solares, interligados dispensam o uso de baterias ou mantenedores de carga, os quais angariam 45% do valor total do sistema. Com a retirada do sistema de armazenamento a eficiência sobe 34% descartando as perdas pelo sistema. (SHAYANI, OLIVEIRA, CAMARGO. 2006.).

Novas tecnologias estão emergindo e até 2050 tais tecnologias devem reduzir o custo e o consumo da energia disponível no mercado. (LOVINS, 2012).

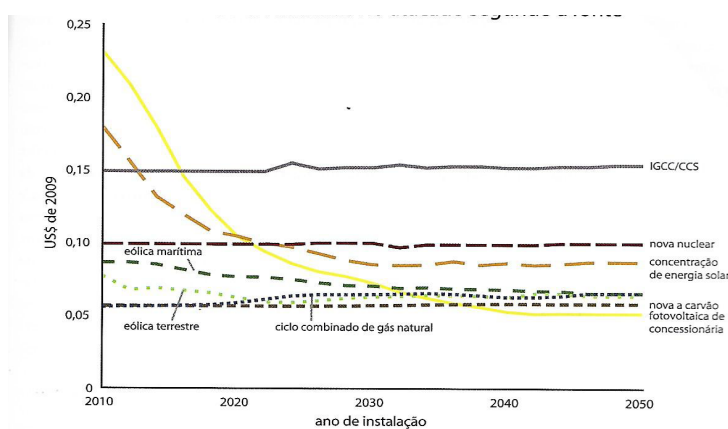


Gráfico 01 – Custo de capacidade instalada por fonte.

Fonte: (LOVINS, 2012. p. 241).

### 3 | METODOLOGIA

A metodologia de concretização do empreendimento consiste em um estudo de caso. O estudo de caso é baseado em conceitos geográficos fundamentais.

Sabendo-se das particulares do município, inicia-se um apanhado geral sobre a influência regional sobre o mesmo. O clima da região sul mineira é o tropical de altitude ou tropical úmido, caracterizado por estações bem definidas, o verão úmido, quente e com grande índice pluviométrico, e inverno com temperaturas baixas e o ar

seco. (COC, 2010).

Em suposição para dimensionamento utilizaremos da averiguação do gasto de energia elétrica localizado próximo ao município de São Thomé das Letras, o qual tem o gasto energético de 1 kW/h.

O dimensionamento do painel solar utiliza-se da seguinte fórmula:

$$NP = \frac{CDE}{EFP} \cdot (1 + F)$$

Onde:

NP = Número de placas do painel..

CDE = Consumo diário de energia [W.h/d].

EFP = Energia fornecida por placa [W.h/d].

F = Fator de segurança (entre 0,2 e 0,3).

Neste caso estamos considerando que o painel será o demonstrado por Maciel, Lopes e Lima (2008), o qual possui 0,4m<sup>2</sup> de área coletora e fornece em média 150 W.h/d.

$$NP = (CDE/EFP) \cdot (1+F)$$

$$CDE = 1 \text{ kW.h/d}$$

$$EFP = 150 \text{ W.h/d}$$

$$F = 0,25$$

NP = 8.333 placas, por arredondamento para que não haja falta de energia, o número de placas que serão utilizadas será de nove.

O número de baterias deverá ser o mesmo do número de placas, segundo Maciel, Lopes e Lima (2008), ou seja, será nove baterias de 100 A.h.

Sabendo-se do número de baterias do sistema, torna-se possível determinar a autonomia do sistema. Adotando-se a corrente total consumida pelos equipamentos de 200 A.h/d.

$$Autonomia = \frac{CD}{CDIA}$$

$$CD = NP \cdot 100 [A.h]$$

CD = Carga disponível [A.h].

CDIA = Consumo Diário [A.h/d].

NP = Número de painéis.

Autonomia = 5 dias.

Tendo dimensionado a micro usina de captação de energia solar, inicia-se o aproveitamento da energia eólica.

Uma usina eolielétrica (UEE) é um conjunto de turbinas eólicas dispostas adequadamente em uma mesma área. Essa proximidade geográfica tem a vantagem econômica da diluição de custos: arrendamento de área, fundações, aluguel de guindastes e custos de montagem, linhas de transmissão, equipes de operação e manutenção e estoques de reposição. Usinas eólicas com turbinas de projeto consolidado e equipes de manutenção adequadamente capacitadas apresentam fatores de disponibilidade próximos de 98%. Usualmente, a geração elétrica inicia-se com velocidades de vento da ordem de 2,5 a 3,0 m/s; abaixo destes valores o conteúdo energético do vento não justifica aproveitamento. (AMARANTE, 2010).

Através do gráfico abaixo, é possível determinar a velocidade média (m/s) do local de implementação dos aero geradores, os quais serão fonte energética complementar aos painéis solares, dando seguimento à hipótese de recuperação da energia solar perdida devido a influência de nuvens.

Velocidade média do vento sete m/s gráfico adaptado do atlas eólico mineiro

Para averiguação do potencial eólico, utilizaremos de dados já apresentados anteriormente, como: a equação da potencia disponível na seção transversal do aero gerador, a velocidade média de 7 m/s segundo Atlas eólico Mineiro (2010), a densidade de  $1,068 \text{ kg/m}^3$  a  $20^\circ\text{C}$ , sabendo-se da altitude média de São Thomé das Letras, próxima a 1440m, e que sua rugosidade é 0,3.

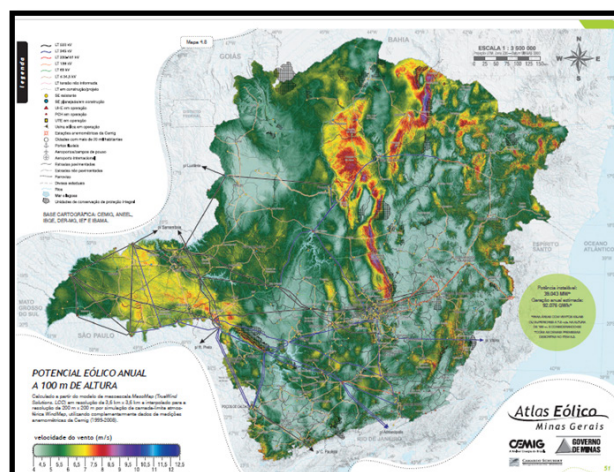


Figura 24 – Potencial eólico anual.

Fonte: Adaptado de Atlas Eólico Mineiro (AMARANTE 2010).

A altura da torre onde será acoplado o aero gerador será de 100m de altura, para dar maior verossimilhança na avaliação do potencial disponível no aero gerador, pois os dados obtidos da velocidade do vento pelo Atlas Eólico Mineiro (2010) referem-se a esta altura. Para dimensionamento dos aero geradores utilizaremos o raio do aero gerador sendo de 2m.

Dimensionamento da potência a disponível no aero gerador:



$$P = \frac{1}{2}(\rho \cdot A \cdot v^3)$$

$$A = \pi \cdot r^2 = [12,566 \text{ m}^2]$$

$$\rho = 1,068 \text{ [kg/m}^3]$$

$$V = 7 \text{ [m/s]}$$

$$P = (12,566 \times 1,068 \times (7)^3) / 2 = 2.301,682 \text{ [W.h]}$$

Após o dimensionamento da potencia disponível no aero gerador, averígua-se a potencia elétrica gerada pelo mesmo, utilizando-se da fórmula:

$$P_g = 0,3 \cdot P_D \cdot c_p$$

$P_g$  = Potencia gerada.

$c_p$  = Fator de capacidade.

0,3 \*previamente adotado pela literatura de Sá e Lopes.

O fator de capacidade ( $c_p$ ) é obtido pela relação entre a potencia elétrica possível de ser gerada e a potencia nominal obtida do sistema eólico a ser utilizado. O valor de  $c_p$  está diretamente ligado com o regime dos ventos do local. Quando a potencia elétrica possível de ser gerada for igual a potencia nominal obtida do sistema eólico, o fator de capacidade será igual a 1. Esta seria a condição ideal, que é obtida somente em alguns momentos, quando os ventos atingem a velocidade nominal do aero gerador. Sendo assim, podemos dizer que o valor de  $c_p$ , geralmente, será inferior a 1. Em média para o Brasil, este valor é aproximadamente 0,3. (SÁ; LOPES, 2001. p. 92-93).

$$P_g = 0,3 \cdot 2.301,682 \cdot 0,3$$

$$P_g = 207,151 \text{ [W.h]}$$

“Durante esse processo, a gente também descobriu que a mesma máquina que tinha 28% a 30% de fator de produtividade na Europa e nos Estados Unidos, aqui no Brasil, batia os 50%, graças aos nossos ventos”. (GANNOUN. 2016).

Podendo assim alterar os valores acima, por não haver outras referencias válidas, decide-se por manter o valor previamente adotado.

#### 4 | DISCUSSÃO FINAL

O problema de mudanças climáticas em decorrência do aquecimento global está diretamente vinculado às opções energéticas adotadas por cada nação, sendo também um reflexo de seu padrão de consumo. (...) Os desequilíbrios ambientais hoje observados são uma consequência do somatório do histórico mundial, das opções energéticas adotadas principalmente pelos países desenvolvidos.

Através de baixos investimentos em curto prazo, com grande potencial crescente

a médio e longo prazo, a construção de uma micro usina mista de energia alternativa poderá ser de auxílio ao desenvolvimento sustentável de três maneiras: possibilitando o desenvolvimento econômico através da venda de energia e créditos de carbono, auxiliando na conclusão de metas energéticas nacionais para universalização da energia, recuperação de dejetos antes descartados de maneira irresponsável na natureza.

A venda energética realizar-se-á através de leilões organizados por instituições reguladoras das necessidades energéticas regionais, ou através do aprimoramento das redes elétricas, o qual é meta nacional para atingir melhor eficiência das mesmas através do uso de uma tecnologia inovadora e promissora (Smart Grid).

As metas energéticas nacionais são de 400 mil ligações elétricas que beneficiarão 1000000 de pessoas.

A possibilidade da obtenção de incentivos econômicos, através de financiamentos como, por exemplo, o Programa de Incentivo às Fontes Alternativas de Energia Elétrica (Proinfa), financiado pela CAIXA.

A construção de uma micro usina mista de energia alternativa torna-se eficiente, observando as vertentes econômicas e as necessidades energéticas crescentes em um país emergente como o Brasil.

O crescimento da população e a demanda maior de produção, associados a padrões não sustentáveis de consumo afetam o uso da terra, água, ar, entre outros recursos. Para que sejam sanadas tais adversidades há a necessidade de desenvolver estratégias para mitigar o impacto antropológico no meio ambiente e o impacto adverso das mudanças ambientais sobre a humanidade.

Geralmente essas estratégias de apoio ao desenvolvimento sustentável instituem que os países deverão aperfeiçoar os programas com uma visão progressista, onde os objetivos devem incluir: mitigação da pobreza, garantir os meios de subsistência, condições adequadas de saúde, qualidade de vida, etc.

Deve-se aumentar a capacidade de estruturas nacionais, regionais e locais de dedicar-se a questões relativas a tendências energéticas sustentáveis. A estratégia adotada pela pesquisa mitiga o impacto adverso das atividades humanas sobre o meio ambiente atingindo objetivos designados na Conferencia das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento como requisitado em documento. (Agenda 21).

Através dos dados apresentados acima conclui-se que os objetivos da Agenda 21 atingidos são: Promoção do desenvolvimento econômico e ambiental mutuo, estimula a produtividade e a competitividade de maneira construtiva por parte da indústria energética a lidar com questões relativas ao meio ambiente, promove investimentos e infraestrutura necessárias ao crescimento econômico diversificado sustentável sobre uma base ambiental saudável, cria oportunidade para pequenas de pequeno porte onde as comunidades locais possam contribuir para o desenvolvimento, etc.

## REFERÊNCIAS

- AMARANTE, Odilon A. Camargo do; SILVA, Fabiano Jesus Lima da; ANDRADE, Paulo Emiliano Piá de. **Atlas Eólico Mineiro**. Belo Horizonte: Cemig, 2010.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13030**: Elaboração e apresentação de projeto de reabilitação de áreas degradadas pela mineração. Rio de Janeiro. 1999.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13029**: Mineração - Elaboração e apresentação de projeto de disposição de estéril em pilha. Rio de Janeiro. 2006.7
- BASTOS, Mário; SILVA, Isabel Azevedo. **Restauração, Reabilitação e Reconversão na Recuperação Paisagística de Minas e Pedreiras**. 2017.
- BLUESOL. 2016. Os Sistemas Solar de Energia Fotovoltaica, Livro Digital de Introdução aos sistemas solares.
- BRASIL. Decreto Lei nº 227 de 28 de Janeiro de 1967. Brasília: Presidência da República. 1967. Disponível em: < [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto-lei/De10227.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto-lei/De10227.htm)> Acesso em: 02/06/2017 12:05.
- CONFERENCIA DAS NAÇÕES UNIDAS SOBRE O MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO. **Agenda 21**. ONU. 1992.
- BRASIL. Decreto Lei nº 7.772 de 8 de Setembro de 1980. Brasília: Senado. 1980. Disponível em: < <http://www.siam.mg.gov.br/sla/download.pdf?idNorma=5407>> Acesso em: 02/06/2017 13:41.
- CARVALHO, Regina Paula Bendetto. **Contribuições da análise de geossistemas na recuperação e áreas degradadas pela mineração**. 2011
- COPAM. Deliberação Normativa nº74 de 9 de Setembro de 2004. Disponível em: < <http://sisemanet.meioambiente.mg.gov.br/mbpo/recursos/DeliberaNormativa74.pdf>> Acesso em: 02/06/2017. 13:25.
- COPAM. Deliberação Normativa nº104 de 16 de Novembro de 2006. Disponível em: < <http://www.siam.mg.gov.br/sla/download.pdf?idNorma=6299>> Acesso em: 02/06/2017. 13:25.
- CUSTOS E RENTABILIDADE [2017?]. Disponível em: <<https://evolucaoenergiaeolica.wordpress.com/custo/>>. Acesso em: 03 de maio. 2017.
- Dados Geográficos de São Thomé das Letras. IBGE. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=316520>> Acesso em: 07/05/2017.
- Energia eólica brasileira e mais barata do mundo. [2016?]. Disponível em: <<http://epocanegocios.globo.com/Caminhos-para-o-futuro/Energia/noticia/2016/04/energia-eolica-brasileira-e-mais-barata-do-mundo-diz-presidente-executiva-da-abeeolica.html>>. Acesso em: 03 de maio>. 2017.
- Energia Eólica e o meio ambiente [2002]. Disponível em: <[http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?pid=MSC0000000022002000100002&script=sci\\_arttext](http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?pid=MSC0000000022002000100002&script=sci_arttext)>. Acesso em: 03 de maio. 2017.
- GLOBAL WIND ENERGY COUNCIL. **Global Wind Report: annual market.2011**.
- GUIA EXAME. **Sustentabilidade**. São Paulo. Abril, 2013.
- HISTÓRIA da Sustentabilidade. [2016?]. Disponível em: <<http://epocanegocios.globo.com/Caminhos-para-o-futuro/Energia/noticia/2016/04/energia-eolica-brasileira-e-mais-barata-do-mundo-diz-presidente-executiva-da-abeeolica.html>>. Acesso em: 03 de maio. 2017.

IBRACOQUE MINERAÇÃO LTDA. **PRAD - PLANO DE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS**. LAURO MULLER. 2008. Disponível em: <[https://www.jfsc.jus.br/acpdocarvaio/conteudo/ibramil/prads/set\\_2010/PRAD\\_PONTE\\_ALTA.pdf](https://www.jfsc.jus.br/acpdocarvaio/conteudo/ibramil/prads/set_2010/PRAD_PONTE_ALTA.pdf)> Acesso em: 02/06/2017 10:15.

LEMOS, Elianne Christine; **RECUPERAÇÃO DE ÁREA DEGRADADA PELA ATIVIDADE MINERÁRIA: ANÁLISE DA EFETIVIDADE LEGAL EM MINAS GERAIS**. Disponível em: <[http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/10833/1/TESE\\_Recupera%C3%A7%C3%A3o%20de%20%C3%A1rea%20degradada%20pela%20atividade%20miner%C3%A1ria%20an%C3%A1lise%20da%20efetividade%20legal%20em%20Minas%20Gerais.pdf](http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/10833/1/TESE_Recupera%C3%A7%C3%A3o%20de%20%C3%A1rea%20degradada%20pela%20atividade%20miner%C3%A1ria%20an%C3%A1lise%20da%20efetividade%20legal%20em%20Minas%20Gerais.pdf)> Acesso em: 02/06/2017 09:57.

LOVINS. Amory B.; Rocky Mountain Institute. **Reinventando o Fogo**. São Paulo, Cultrix. 2013.

MACIEL, Nelson Fernandes; LOPES, José Dermeval Saraiva; LIMA, Francisca Zenaide de. **Energia Solar para o Meio Rural – Fornecimento de Eletricidade**. Viçosa, CPT, 2008.

Manual de Orientação Atuação Profissional na Área Ambiental. [2010?]. Disponível em: <<http://www.crea-mg.org.br/publicacoes/Cartilha/Manual%20de%20Orienta%C3%A7%C3%A3o%20-%20Atua%C3%A7%C3%A3o%20do%20Profissional%20na%20%C3%81rea%20Ambiental.pdf>>. 2017.

NATIONAL GEOGRAFIC BRASIL. **Edição especial energia**. São Paulo: Abril cultural, 2012.

PEREIRA, Enio Bueno et al. **Atlas Brasileiro de Energia Solar**. São José dos Campos: INPE, 2006.

PRETOR-PINNEY, Gavin. **Guia do Observador de Nuvens**. Tradução Claudio Figueiredo. Rio de Janeiro: Intrínseca, 2008.

RIBEIRO, Ruben Cesar de Maria Souza. **Energia Limpa: energia eólica para produção de energia elétrica**. Varginha: Unis-MG, 2012.

SÁ, Antônio Leite; LOPES, José Dermeval Saraiva. **Energia Eólica para Geração de Eletricidade e Bombeamento de Água**. Viçosa. CPT. 2001.

SANTOS, Maria Guimarães Vieira dos. **Avaliação da Reabilitação In Loco com espécies Nativas, de Pilha de Estéril Gerada por Mineração de Quartzito, no Município de São Thomé as Letras, Minas Gerais**. Belo Horizonte: UFMG. 2005.

SEIFFERT, Mari Elizabete Bernardini. **Mercado de Carbono e Protocolo de Quioto: oportunidades de negócio na busca da sustentabilidade**. São Paulo: Atlas, 2009.

SHAYANI, Rafael Amaral; OLIVEIRA, Marco Aurelio Gonçalves de; CAMARGO, Ivan Marques Toledo. **Comparação do Custo entre Energia Solar Fotovoltaica e Fontes Convencionais**. Brasília. 2006

SILVA. Elias. **Técnicas de Avaliação de Impactos Ambientais**. Viçosa. CPT. 1999.

## COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E TOXICIDADE DAS FOLHAS DE *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez (LAURACEAE)

### **Viviane Mallmann**

Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul,  
Doutoranda no Programa de Pós-Graduação em  
Recursos Naturais  
Naviraí-MS

### **Lucas Wagner Ribeiro Aragão**

Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul,  
Mestre no Programa de Pós-Graduação em  
Recursos Naturais  
Naviraí-MS

### **Edineia Messias Martins Bartieres**

Universidade Federal da Grande Dourados,  
Mestranda no Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Geral/ Bioprospecção  
Dourados-MS

### **Valdeci José Pestana**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná,  
Mestrando no Programa de Pós-Graduação em  
geografia.  
Marechal Cândido Rôndón-Pr

### **Shaline Séfara Lopes Fernandes**

Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul,  
Bolsista no Programa de Pós-doutorado em  
Recursos Naturais  
Dourados-MS

### **Rogério César de Lara da Silva**

Universidade Estadual do Mato Grosso do  
Sul, Pesquisador do CDTEQ-Centro de  
desenvolvimento de Tecnologias Químicas.  
Naviraí-MS.

### **Tauane Catilza Lopes Fernandes**

Universidade Federal do Ceará-Doutoranda no

programa de Pós-Graduação em Zootecnia.  
Fortaleza-Ce

### **Ana Francisca Gomes da Silva**

Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul,  
Pesquisadora em Química orgânica-Laboratório  
Química de Produtos Naturais.  
Mundo Novo-MS.

**RESUMO:** O uso de plantas como medicamentos alternativos existe desde os primórdios da civilização humana e muitos desses conhecimentos foram passados de geração a geração. Compostos de plantas apresentam grande diversidade estrutural, infelizmente, uma pequena proporção desta diversidade tem sido explorada quanto seu potencial farmacológico. O presente artigo foi realizado com o extrato etanólico e frações das folhas de *Nectandra megapotamica* para avaliar a composição fitoquímica e sua toxicidade e letalidade sobre *Artemia salina*. A análise fitoquímica mostrou presença de alcaloides, glucosídeos cardiotônicos, cumarinas voláteis, flavonoides, taninos, saponinas, triterpenos, proteínas e aminoácidos e ácidos orgânicos. Todos, extrato e frações, apresentaram dose letal média ( $DL_{50}$ ) entre 36 e 272  $\mu\text{g/mL}$ , provocando letalidade considerável em *A. salina*. Os dados mostram que *N. megapotamica* possuem compostos biologicamente ativos, portanto, pode ser

considerada como uma fonte de biocompostos em prospecção.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Artemia salina*-Fitoterápicos-Canela-louro-DPPH.

**ABSTRACT:** The use of plants as alternative medicines has existed since the dawn of human civilization, and many of these knowledge have been handed down from generation to generation. Plant compounds have great structural diversity, unfortunately, a small proportion of this diversity has been explored as to its pharmacological potential. The present article was carried out with the ethanolic extract and fractions of the leaves of *Nectandra megapotamica* to evaluate the phytochemical composition and its toxicity and lethality on *Artemia salina*. Phytochemical analysis showed the presence of alkaloids, cardiogenic glucosides, volatile coumarins, flavonoids, tannins, saponins, triterpenes, proteins and amino acids and organic acids. All extracts and fractions presented a median lethal dose (LD50) between 36 and 272 µg/mL, causing considerable lethality in *A. salina*. The data show that *N. megapotamica* possess biologically active compounds, therefore, it can be considered as a source of biocomposites in prospecting.

**KEYWORDS:** *Artemia salina*-Phytotherapy-Cinnamon-bay-DPPH.

## INTRODUÇÃO

A família Lauraceae, uma das mais primitivas das angiospermas, é representada por mais de 2.750 espécies, distribuídas em 52 gêneros, encontradas em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo, especialmente nas florestas centro e sul-americanas. No Brasil são relatadas 22 gêneros e aproximadamente 400 espécies (SOUZA & LORENZI, 2012).

Esta família possui considerável importância econômica, pois suas madeiras de boa qualidade são usadas em construções e na fabricação de móveis, algumas são frutíferas, oleaginosas, fornecedoras de óleos essenciais e condimentos, os quais alcançam um alto valor no comércio, além de muitas outras serem usadas na medicina popular, destacando-se os gêneros: *Aniba*, *Ocotea*, *Nectandra*, *Persea* e *Cinnamomum* (ALCÂNTARA *et al.*, 2010).

Destes, o gênero *Nectandra* é constituído de 112 espécies, amplamente utilizadas na medicina popular devido à sua atividade antirreumática, digestiva e diurética, tendo algumas das propriedades medicinais por alguns estudos, como antifúngico, antimalárico, anti-inflamatório, antipirético e usado contra cólicas e problemas gástricos (MARQUES, 2001, SILVA FILHO *et al.*, 2004, MELO *et al.*, 2006). Dentre as espécies representativas pode-se citar *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez, vulgarmente conhecida como canela-louro, canela-preta e canela-fedorenta, utilizada na medicina popular como anti-inflamatório, antirreumático e analgésico (SILVA FILHO *et al.*, 2004). Porém, há poucos estudos que visam à comprovação de suas propriedades farmacológicas, bem como, de seus constituintes químicos. Com base nas considerações apontadas, o presente artigo teve como objetivo realizar um



estudo químico, através do screening fitoquímico na espécie *N. megapotamica* com a finalidade de identificar os principais grupos orgânicos, avaliar sua toxicidade frente *Artemia salina* bem como averiguar sua capacidade antioxidante.

## MATERIAIS E MÉTODOS

As folhas de canela-louro foram coletadas no município de Mundo Novo, situado no sudoeste de Mato Grosso do Sul (localiza-se na latitude 23°56'16" S e longitude 54°16'15" W). Sendo a planta foi identificada taxonomicamente como *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez, O material testemunho foi comparado com exsicata depositada no Herbário DDMS da Universidade Federal da Grande Dourados sob nº 292. Após a coleta, cerca de 850g das folhas foram secas, moídas e posteriormente extraídas exaustivamente com etanol em extrator de Soxhlet. Cada extrato resultante foi filtrado e concentrado sob pressão reduzida até consistência xaroposa e particionado com solventes de polaridade crescente, para então serem submetidos ao screening fitoquímico, bioensaio de toxicidade com *Artemia salina* Leech e a atividade antioxidante com 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

Os procedimentos para a identificação química dos extratos obtidos foram adotados em função das classes químicas, de acordo com os protocolos descritos por Simões (SIMÕES et al., 2010). A toxicidade dos extratos em estudo foi avaliada frente à *A. salina*, de acordo com método proposto por Meyer et al., (1982). A atividade radicalar foi realizada utilizando o radical 1,1-difenil-2- picril-hidrazil (DPPH) como descrito por Brand-Wilians (1995), como padrão antioxidante a rutina, nas mesmas concentrações dos extratos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes analíticos preliminares revelaram nos extratos das folhas resultados positivos em comum para alcaloides, flavonoides, taninos, triterpenos e ácidos orgânicos (Tabela 1).

Classe	Extrato etanólico	Fração hexânica	Fração clorofórmica	Fração acetato de etila	Fração N-butanólica
Alcaloides	+++	-	+	+	++
Glucosídeos cardiotônicos	++	++	-	-	+
Cumarinas voláteis	+	-	-	++	+++
Flavonoides	+	+	-	+++	+++
Taninos	+++	+++	+	+++	+++
Saponinas	-	-	+	++	+++
Triterpenos	++	++	-	++	+

Proteínas e aminoácidos	+++	-	-	+++	+++
Ácidos Orgânicos	+	+++	+++	+++	+++
DL <sub>50</sub> (µg/mL)	36,35	76,56	259,13	272,25	Não realizado

Tabela 1. Triagem fitoquímica de classe de metabólitos secundários presentes no extrato etanólico e das frações obtidas de *N. megapotamica*, bem como, resultado do teste de toxicidade para *A. salina*.

Resultados: (+) baixa intensidade, (++) média intensidade, (+++) alta intensidade, (-) ausência de composto.

Com a finalidade de avaliar a capacidade dos constituintes do extrato etanólico e da fração hexânica de *N. megapotamica* em capturar radicais livres (DPPH) foi realizada a análise de soluções deste extrato e fração com DPPH. (Figura 1).

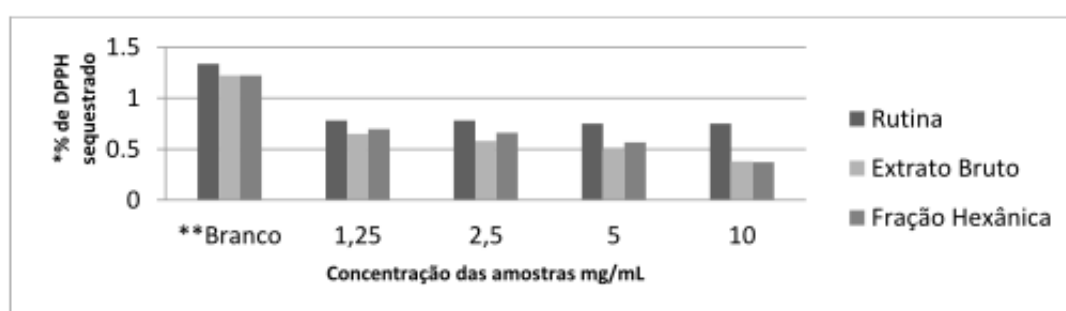


Figura 1. % de DPPH sequestrado dos extratos para o teste quantitativo da atividade antioxidante.

\* Absorbância da mistura DPPH + metanol+amostra, após trinta minutos de reação. \*\* O branco se refere a mistura DPPH + metanol, após trinta minutos de reação

Os resultados foram expressos pela inibição de oxidação, ou seja, da atividade antioxidante, que é correspondente à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, mostra que o extrato bruto foi mais eficiente do que a fração hexânica, o que é esperado. Pois, geralmente a fração hexânica tem menor concentração de compostos fenólicos e, por tanto maior atividade antirradicalar. Todas as amostras apresentaram capacidade de consumo de DPPH, visto que as absorbâncias após reação de DPPH com as diferentes concentrações das amostras testadas foram significativamente menores em se comparando com as absorbâncias obtidas para o controle (Rutina), o que pode demonstrar preliminarmente a atividade antioxidante para o extrato e fração testada.

Meyer e colaboradores, em 1982, estabeleceram uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal média, DL<sub>50</sub>, apresentada por extratos de plantas sobre larvas de *A. salina*, desde então, considera-se que quando são verificados valores acima 100µg/mL<sup>-1</sup>, estes, são considerados atóxicos. Portanto os valores encontrados na Tabela 1 indicam potencial tóxico para os extratos testados.

Esses resultados sugerem que a toxicidade encontrada pode estar relacionada

aos grupos de metabólitos secundários revelados nos extratos, uma vez que tais grupos demonstram grande potencial farmacológico. O ensaio de toxicidade para *A. salina* baseia-se na correlação observada entre a toxidez sobre o microcrustáceo e a citotoxicidade sobre células cancerosas do tipo P-388 (MEYER et al., 1982).

## CONCLUSÃO

Os valores de toxicidade de extratos de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez nos ensaios *in vitro* frente à *Artemia salina* Leach, demonstram uma efetiva atividade tóxica, resultado este que pode ser associado a grande variedade de compostos bioativos presentes nos extratos e também sugere que esta planta pode apresentar outras atividades biológicas de interesse farmacológicas. Logo pode ser observado que a planta apresentou potencial antioxidante, que está correlacionado aos compostos fenólicos presentes nas amostras testadas.

## REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA JM, YAMAGUCHI KKL, VEIGA-JUNIOR VF. 2010. Composição química de óleos essenciais de espécies de Aniba e Licaria e suas atividades antioxidante e antiagregante plaquetária. **Química Nova** 33(1): 141-145.
- BRAND-WILLIAMS W, CUVELIER ME, BERSET C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel - Wissenschaft Technologie** 28(1): 25-30.
- MARQUES CA. 2001. Importância da família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente** 8(1): 195-206.
- MELO CT, MONTEIRO AP, LEITE CP, ARAUJO FL, LIMA VT, BARBOSA-FILHO JM, FONTELES FMM, VASCONCELOS SM, VIANA BGS, SOUZA FC. 2006. Anxiolytic-like effects of (O-methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl- tyramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae) in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin** 29: 451-454.
- MEYER BN, FERRIGNI NR, PUTNAM JE, JACOBSEN LB, NICHOLS DE, MCLAUGHLIN JL. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active-plant constituents. **Planta Médica** 45(5):31-34.
- SILVA FILHO AA, SILVA MLA, CARVALHO JCT, BASTOS JK. 2004. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of *Nectandra megapotamica* (Lauraceae) in mice and rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** 56(9): 1179-1184.
- SIMÕES CMO, SCHENKEL EP, GOSMANN G, MELLO JCP, MENTZ LA, PETROVICK PR. 2010. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6ª edição (1ª reimpressão), Porto Alegre- Florianópolis: **Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC**, 1104p.
- SOUZA VC, LORENZI H. 2012. Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação de famílias fanerógamas nativas e exóticas do Brasil, baseado em APG III. **Instituto Plantarum** 3: 768p.

## CRESCIMENTO DE MUDAS DE *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd. (Fabaceae) EM SUBSTRATOS ORGÂNICOS COMPOSTOS COM RESÍDUOS DE CASTANHA-DO-BRASIL

**Givanildo Sousa Gonçalves**

Instituto Federal de Mato Grosso - IFMT.  
Confresa-MT

**Lúcia Filgueiras Braga**

Universidade do Estado de Mato Grosso –  
UNEMAT, Faculdade de Ciências Biológicas  
e Agrárias. Laboratório de Ecofisiologia e  
Propagação de Plantas. Alta Floresta-MT

**Letícia Queiroz de Souza Cunha**

Secretaria de Educação do Estado de Mato  
Grosso - SEDUC. Matupá-MT

**RESUMO:** A análise do crescimento tem importância na avaliação do comportamento das mudas, descrevendo as condições morfofisiológicas ao longo do crescimento. Este trabalho teve como objetivo analisar o crescimento de mudas de *Dipteryx odorata*, em diferentes composições de substratos orgânicos compostos com resíduos de amêndoas de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*). O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com quatro tratamentos e oito repetições, cada repetição foi formada pela média de quatro plantas. Os tratamentos foram T1: substrato comercial Vivatto Plus®; T2: substrato orgânico casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + casca arroz carbonizada (3:7); T3: substrato orgânico casca de amêndoas de

castanha-do-Brasil + esterco equino (3:7); T4: substrato orgânico casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + esterco equino + casca café (1:1:1). Aos 28 dias após o transplante para tubetes com capacidade para 50 cm<sup>3</sup> de substrato, foi realizada a avaliação inicial e consecutivamente aos 30, 60, 90 e 120 dias, avaliando-se a área foliar, massa seca de folha, massa seca total, área foliar específica, razão de área foliar, taxa assimilatória líquida e taxa de crescimento relativo. As mudas de *D. odorata* crescidas nos substratos orgânicos contendo casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + esterco equino (3:7) e casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + esterco equino + casca de café (1:1:1), apresentaram os melhores índices de crescimentos, podendo substituir o substrato comercial Vivatto Plus®.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cumaru, *Bertholletia excelsa*, produção de mudas, resíduos orgânicos, recursos naturais.

GROWTH OF CHANGES OF *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd. (Fabaceae) IN ORGANIC SUBSTRATES COMPOUNDED WITH CASTANHA-DO-BRASIL RESIDUES

**ABSTRACT:** Growth analysis is important in evaluating the behavior of the seedlings, describing the morphophysiological conditions

along the growth. The objective of this work was to analyze the growth of *Dipteryx odorata* seedlings in different compositions of organic substrates composed of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). The experimental design was completely randomized with four treatments and eight replicates, each replicate being formed by the average of four plants. The treatments were T1: commercial substrate Vivatto Plus®; T2: organic substrate peel of Brazil nut nuts + charcoal rice husk (3:7); T3: organic substrate bark of Brazil nut almonds + equine manure (3:7); T4: organic substrate peel of Brazil nut nuts + equine manure + coffee husk (1:1:1). At 28 days after transplanting for tubes with 50 cm<sup>3</sup> capacity of substrate, the initial and consecutive evaluation was performed at 30, 60, 90 and 120 days, evaluating leaf area, leaf dry mass, total dry mass, specific leaf area, leaf area ratio, net assimilation rate, and relative growth rate. The seedlings of *D. odorata* grown on organic substrates containing Brazil nut cashew + equine manure (3:7) and Brazil nut cashew + equine manure + coffee husk (1:1:1), presented the best growth rates and could replace the commercial substrate Vivatto Plus®.

**KEYWORDS:** Cumaru, *Bertholletia excelsa*, production of seedlings, organic waste, natural resources.

## 1 | INTRODUÇÃO

*Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd, (Fabaceae) é uma planta arbórea nativa na América do Sul, com predominância nas terras altas da Amazônia, com árvores que atingem até 40 metros de altura, classificada como planta clímax ou clímax exigente em luz (CARVALHO, 2009). Esta espécie é conhecida popularmente como cumaru, apresentando importância para reflorestamentos e plantios comerciais devido às diversas aplicações de sua madeira e semente (PINTO et al., 2008).

A madeira de *D. odorata* é densa a muito densa, sendo empregada na construção civil, implementos agrícolas, construção naval, confecção de cabos de ferramentas, estacas, carrocerias de caminhões, assoalhos, vigamentos e moveis, sendo considerada uma das melhores madeiras para dormentes, pela durabilidade e por não rachar quando exposta ao sol. Do cozimento dos frutos e das sementes, obtém-se um tipo de remédio com propriedades anestésicas que auxilia no tratamento de problemas respiratórios e cardíacos, além de combater vermes. Com a casca, prepara-se um xarope usado no combate a tosses, gripes e problemas pulmonares. As sementes contêm um óleo essencial aromático usado na indústria de perfumaria e de cosméticos, podendo ser usado em úlcera bucal, otite, em problemas no couro cabeludo e como diaforéticas ou sudoríficas. Esse óleo também pode ser usado na formulação de veneno para matar ratos, por sua capacidade de inibir a coagulação do sangue (CARVALHO, 2009). Apesar de sua importância, o plantio de *D. odorata* como de qualquer outra espécie florestal, está condicionada a produção de mudas, sendo esse um dos principais entraves no avanço de áreas cultivadas.

Na produção de mudas, diversos fatores devem ser levados em consideração, entre eles as sementes, o recipiente e os substratos tem elevada participação devendo

garantir condições possíveis à germinação e o enraizamento. Portanto, o substrato é um dos mais importantes insumos utilizados na obtenção de mudas precoces e de baixo custo final (TRAZZI et al., 2012). Na obtenção de um substrato de qualidade e de baixo custo é necessário que os componentes sejam facilmente encontrados e que apresentem custos reduzidos, devendo estes conter elevado valor nutricional e características físicas adequadas ao crescimento do sistema radicular, além de disponibilizar água. Nesse contexto se insere a adubação orgânica em substituição a adubação mineral, como forma sustentável de produção de mudas (FREITAS et al., 2014).

A utilização de casca de amêndoas de castanha-do-Brasil como fonte de matéria orgânica para compor substratos, torna-se uma alternativa na redução dos custos de produção das mudas, devido ser encontrada com abundância na Amazônia, e apresentar características adequadas a composição de substratos, por possuir consideráveis concentrações de Ca e Mg, garantindo adequado crescimento as plantas (MARANHÃO et al., 2013). Gonçalves et al. (2019) também avaliaram composições de substratos contendo resíduos de castanha-do-Brasil e consideraram os valores de macroporosidade (Ma) e porosidade total (PT) adequados, elevada capacidade de retenção de água, enquanto os valores densidade global e microporosidade foram considerados médios.

O crescimento das plantas pode ser determinado utilizando fórmulas matemáticas, quantificando a produção do vegetal e de diferentes órgãos no crescimento inicial, intermediário e final. Por esse método é possível obter informações em intervalos regulares de tempo, utilizando as variáveis representadas pelos órgãos da planta, como fitomassa ou matéria seca de órgãos e área foliar do aparelho fotossintético (PEIXOTO et al., 2011). Esse tipo de verificação é conhecido como análise do crescimento, tendo importância na avaliação do comportamento das plantas, na descrição das condições morfológicas em diferentes intervalos de tempo, acompanhando seu crescimento (BARBIERI et al., 2011). Esse método é utilizado como ferramenta que permite conhecer diferenças funcionais e estruturais das plantas, podendo-se inferir sobre as atividades fisiológicas, estimando precisamente as causas de variações no crescimento de plantas da mesma espécie ou de plantas crescidas em diferentes ambientes (PEIXOTO et al., 2011).

Com base no exposto, esse trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento de mudas de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd. submetidas a diferentes composições de substratos orgânicos compostos por casca de amêndoas de castanha-do-Brasil.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Viveiro Florestal Flora Ação mudas e Reflorestamento LTDA, localizado no município de Alta Floresta Estado de Mato Grosso sob as



coordenadas geográficas 56°01'88" W e 09°54'70" S. Segundo Köppen-Geiger (1928), o clima da região é definido como tropical de monções Am, com temperatura média anual de 26 °C e precipitação anual em torno de 3000 mm.

O viveiro de propagação de plantas possuía cobertura com tela de polietileno preta, com 50% de capacidade de interceptação da luminosidade. As laterais eram abertas. O sistema de irrigação por aspersão acionava manualmente, quatro vezes ao dia às 7:00, 10:00, 13:00 e 16:00 horas, aplicando uma lâmina de aproximadamente 2 mm de água durante 10 minutos.

As sementes de *Dipteryx odorata* (Aubl. Willd Fabaceae) foram coletadas no município de Colíder-MT. Após 90 dias da colheita 1500 sementes foram semeadas em areia grossa, sendo dispostas em uma única camada à profundidade de 5 cm, em canteiro com dimensões de 1x3x0,2 m (largura x comprimento x profundidade). Aos 28 dias após a semeadura, as sementes com protrusão de raiz mínima de 0,2 cm e máxima de 10 cm, foram retiradas do canteiro e transplantadas para tubetes de 50 cm<sup>3</sup>, contendo as diferentes composições de substratos.

As composições dos substratos e forma de preparo seguiu a mesma metodologia adotada por Gonçalves et al. (2019), sendo os resíduos do tegumento das amêndoas da castanha-do-Brasil triturados em partículas com até 12 mm, utilizando triturador Garthen GT 2.000 L (2,0 CV) e mantidos em decomposição por cinco meses, sendo umedecidos e revolvidos a cada 4 dias durante o período. A casca de café e o esterco equino foram curtidos por dois meses e as cascas de arroz foram carbonizadas e utilizadas após resfriamento.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e oito repetições, cada repetição foi constituída pela média de quatro plantas, totalizando 32 plantas por tratamento. Os tratamentos foram: T1-substrato comercial Vivatto Plus®; T2: substrato orgânico casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + casca arroz (3:7); T3: substrato orgânico casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + esterco equino (3:7); T4: substrato orgânico casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + esterco equino + casca café (1:1:1). A cada composição de substrato utilizado foi adicionado adubo de liberação controlada (Osmocote 14-14-14) na proporção de 5 kg m<sup>3</sup>. A cada composição de substrato utilizado foi adicionado adubo de liberação controlada (Osmocote 14-14-14) na proporção de 5 kg m<sup>-3</sup> de substrato.

Após 28 dias do transplante, foi realizada a avaliação inicial das plantas de *D. odorata* e consecutivamente aos 30, 60, 90, 120 dias após a primeira avaliação, sendo mensuradas as variáveis: **Área foliar (AF)**: Mensurada utilizando um medidor de área foliar LI-3100C, expressa em cm<sup>2</sup>. A área foliar foi definida como o resultado da soma das medidas individuais das áreas de todas as lâminas foliares individuais das plantas de cada repetição. Representando a média das plantas por repetição. **Massa seca de folhas (MSF)**: Peso médio (g), de todas as folhas das plantas. Representando a média das plantas por repetição. Obtido por meio da secagem em estufa de circulação/renovação de ar a 65° C, por 72 horas. **Massa seca total (MST)**: Peso médio (g), de

todas as partes da planta, de todas as plantas de uma repetição. Obtido por meio da secagem em estufa de circulação/renovação de ar a 65° C, por 72 horas. **Área foliar específica (AFE)**: É o comprimento morfológico e anatômico da RAF, porque relaciona a superfície (AF) com a massa seca das folhas (MSF):  $AFE = \frac{AF}{MSF}$ . **Razão de área foliar (RAF dm<sup>2</sup> mg<sup>-1</sup>)**: Expressa a área foliar útil para fotossíntese e será definida como o quociente entre a área foliar (AF), área responsável pela interceptação de energia luminosa e o resultado da fotossíntese:  $AFE = \frac{AF}{MSF}$ . **Taxa assimilatória líquida (TAL mg dm<sup>2</sup> dia<sup>-1</sup>)**: Representa o incremento em matéria seca por cada unidade de superfície de área foliar disponível à planta, durante um certo intervalo de tempo pré-determinado. Será obtida pela equação:  $TAL = \frac{P_2 - P_1}{t_2 - t_1} \times \frac{\ln \frac{A_2 - L_n A_1}{A_2 - A_1}}$ , em que: P = massa seca; t = tempo em dias; 1 e 2 = amostras sucessivas; Ln = logaritmo neperiano; A = amostra. **Taxa de crescimento relativo (TCR mg<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>)**: Representa a quantidade (área, volume, peso) de material existente, durante um intervalo de tempo prefixado, podendo ser calculado pela equação:  $TCR = \frac{\ln \frac{P_2 - L_n P_1}{t_2 - t_1}}$ , em que: Ln = logaritmo neperiano; P = massa seca; t = tempo em dias; 1 e 2 = amostras sucessivas

As médias foram submetidas à análise estatística, e comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o recurso computacional SISVAR (FERREIRA, 2011). Os índices de crescimento foram calculados pelo programa ANACRES. Os resultados foram submetidos à análise de regressão, escolhendo-se os modelos significativos com valor de correção  $\geq 0,5$ .

### 3 | RESULTADO E DISCUSSÃO

As plantas de *D. odorata* não apresentaram diferença estatística significativa para a área foliar nas avaliações aos 30 e 90 dias, aos 60 dias as plantas crescidas nos substratos T1, T3 e T4 apresentaram os maiores valores. Aos 120 dias nos substratos T1, T2 e T4 foi observado as maiores médias de área foliar (Tabela 1).

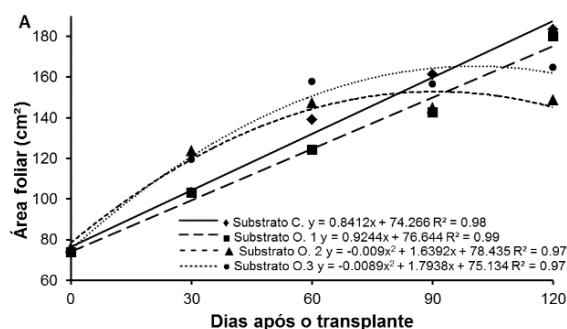
Tratamentos	AI <sup>ns</sup>	Dias após o transplântio				
		30 <sup>ns</sup>	60 <sup>*</sup>	90 <sup>ns</sup>	120 <sup>**</sup>	
Área foliar (cm <sup>2</sup> )						
T1	73,86	102,97	138,99	ab	161,43	183,29 a
T2	73,74	103,08	124,10	b	142,61	180,15 a
T3	75,82	123,73	147,23	ab	144,65	148,72 b
T4	74,73	119,37	157,73	a	156,45	164,74 ab
CV(%)	10,14	18,76	15,93		17,76	9,98
Tratamentos	AI <sup>ns</sup>	Massa seca de folha (mg)				
		30 <sup>ns</sup>	60 <sup>*</sup>	90 <sup>ns</sup>	120 <sup>*</sup>	
T1	198,43	551,89	844,19	ab	967,08	1403,62 ab
T2	194,49	576,70	691,28	b	952,60	1464,68 a
T3	200,98	626,61	806,13	ab	964,22	1197,85 b
T4	201,31	650,17	956,41	a	1043,76	1294,23 ab

CV(%)	10,01	19,70		18,68		19,77	13,77
Tratamentos	AI <sup>ns</sup>	30 <sup>ns</sup>		60*		90 <sup>ns</sup>	120 <sup>ns</sup>
Massa seca total (mg)							
T1	481,41	1135,74	b	1724,13	ab	2253,02	3604,25
T2	494,23	1276,58	ab	1434,41	b	2087,29	3511,23
T3	491,81	1294,26	ab	1615,87	ab	2226,07	3277,55
T4	476,17	1426,19	a	1886,22	a	2506,77	3182,91
CV(%)	15,80	16,23		18,36		20,07	15,03

Tabela 1. Valores médios de área foliar, massa seca de folha e massa seca total de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd., em função de diferentes composições de substratos orgânicos.

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. \* significativo a 5%; \*\* significativo a 1%; <sup>ns</sup> não significativo. %\*\*\*diferença percentual de crescimento entre AI e 150 dias. AI – avaliação inicial. T1 – substrato comercial, T2 – substrato orgânico casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + casca arroz (3:7), T3 – substrato orgânico casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + esterco equino (3:7), T4 – substrato orgânico casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + esterco equino + casca café (1:1:1).

A análise da regressão evidencia que as plantas que cresceram nos substratos T3 e T4 apresentaram maior área foliar até 90 dias e posterior redução. Nos demais substratos ocorreu aumento crescente da área foliar (Figura 1A). Segundo Araújo et al. (2013) a área foliar das plantas é diretamente ligada à produtividade vegetal, responsável pela captação da radiação e conversão em energia orgânica, tendo elevada importância na avaliação do desenvolvimento das mudas produzidas em viveiro. Assim, os resultados de área foliar aos 120 dias indicam que os maiores valores ocorreram nos tratamentos T1, T2 e T4 (Tabela 1). Para Gonçalves et al. (2019) estas mesmas composições de substratos apresentam características físicas de macroporosidade, porosidade total e capacidade de retenção de água adequadas. Entre essas a capacidade de retenção de água tem relação direta com o aumento da área foliar destinada a captação da luminosidade, contribuindo com a maior expansão da AF. Entre os atributos químicos destes substratos, de acordo com GONÇALVES et al. (2019), o Mg, possui relação íntima com a AF devido ser o local onde se reúnem a maior parte das clorofilas que o possuem como componente principal. Desta forma, esse nutriente contribui com o aumento da AF, mas sua absorção não ocorreu em grande quantidade de acordo com estes autores para a espécie *Jaracatia spinosa* (Aubl.) A. DC.



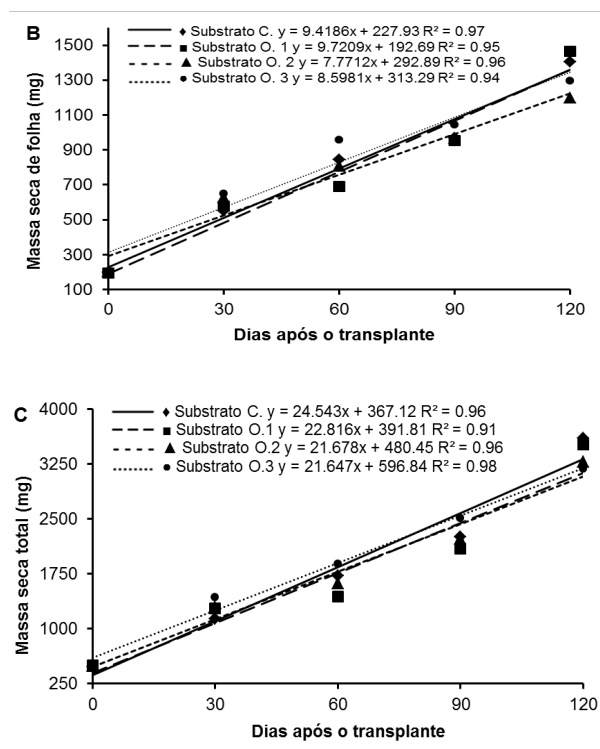


Figura 1. Área foliar (A), massa seca de folha (A) e massa seca total (B) de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd., em função de dias após a primeira avaliação. Função ajustada linear e polinomial quadrática. Significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

As maiores médias de massa seca das folhas (MSF) foram obtidas de plantas que cresceram nos substratos T1, T3 e T4 na avaliação aos 60 dias e T1, T2 e T4 na avaliação aos 120 dias. Não se registrou diferença significativa nas avaliações aos 30 e 90 dias após o transplante (Tabela 1). Constata-se pela análise de regressão ao longo dos 120 dias, que ocorreu aumento linear de MSF das plantas em todos os substratos (Figura 1B).

Os substratos ao qual se observou plantas com maiores valores de MSF nas avaliações aos 60 e 120 dias são os mesmos em que foi observado maiores médias de área foliar. A maior produtividade ocorrida para MSF aos 60 e 120 dias após o transplante, pode ser devido a variações ambientais, ou pela melhor qualidade dos substratos empregados, propiciando condições ao melhor desenvolvimento da planta como relatam Vieira et al. (2014), afirmando que a combinação de materiais pode estabilizar o substrato conferindo adequado valor nutricional e estrutura física possível ao bom crescimento da parte aérea e do sistema radicular. Fato que foi observado por Gonçalves et al. (2019) quando se considera as características físicas de porosidade (macro, micro e total), densidade global, capacidade de retenção de água, umidade (volumétrica e gravimétrica) e químicas dos teores de Ca, Mg, S, N, P, K, Fe, Co, Na, B, Zn, pH e EC das mesmas composições de substratos testadas aqui, estando estas características e atributos adequados ao crescimento de mudas de *D. odorata*.

Os maiores valores de massa seca total (MST) na avaliação aos 30 dias foram observados nas plantas crescidas nos substratos T2, T3 e T4, na avaliação aos 60 dias destacaram-se os substratos SC, SO2 e SO3, não se registrando diferença significativa

nas demais avaliações (Tabela 1). As curvas de regressão lineares demonstram que ocorreu aumento progressivo da massa seca total das plantas de *D. odorata* (Figura 1C).

Entre as características físicas que possuem relação com a MST, as principais são a porosidade (macro e micro) e a capacidade de retenção de água. A macroporosidade se correlaciona com a drenagem e aeração, a microporosidade com retenção de água e nutrientes, ambas apresentam relação com o crescimento do sistema radicular da planta que faz parte da MST, desta forma, o fornecimento de condições para o aumento das raízes também contribui com o crescimento da planta, pela maior exploração de área destinada à absorção de nutrientes e água. Assim, considerando os valores apresentados por Gonçalves et al. (2019), os substratos conferiram características físicas adequadas ao bom crescimento da planta, efeito que foi observado na ausência de diferença significativa entre os tratamentos orgânico e comercial nas avaliações aos 90 e 120 dias para MST (Tabela 1).

Para os atributos químicos dos substratos avaliados, os teores de Ca, Mg, S, Fe e Zn se destacam, conforme Gonçalves et al. (2019). Destes, o Ca e S possuem relação com o crescimento aérea e radicular das plantas. O Ca é constituinte da parede celular das células, atua na ativação de enzimas envolvidas na fotossíntese é indispensável na obtenção de plantas robustas pois garante a multiplicação e crescimento radicular. Também o S possui funções vitais na planta, como constituinte das proteínas e de coenzimas, na fotossíntese atua na síntese da clorofila, absorção de carbono e atividade da rubisco (PES e ARENHARDT, 2015). Neste trabalho o fornecimento destes nutrientes não inferiu prejuízos ao crescimento e acúmulo de massa na planta (Tabela 1), revelando que os teores contidos nos substratos foram adequados.

Os resultados de área foliar específica (AFE) (Figura 2A) demonstram que todos os substratos apresentaram decréscimo linear, indicando aumento da espessura da folha, resultante do aumento do tamanho das células. Segundo Benincasa (2004) no início do desenvolvimento das plantas, a AFE pode ser maior devido às folhas apresentarem-se espessas, com menor acúmulo de massa seca e área foliar, com o crescimento da planta ocorre aumento da área foliar e massa seca das folhas, reduzindo os valores para essa variável ao decorrer do tempo. Peixoto et al. (2011) explica que a AFE é decorrente da divisão da AF pela MSF, em que a AF é o componente morfológico e a MSF é o componente anatômico, estando relacionados com a composição interna formada pelo número e tamanho das células do mesófilo foliar. A fitomassa é o componente fisiológico, onde a razão de massa de matéria seca retida nas folhas se relaciona com a massa de matéria seca acumulada nos diversos órgãos da planta, ocasionando decréscimo da AFE. O decréscimo linear da AFE é explicado pelo aumento mais intenso da MSF em relação a AF, entre a avaliação inicial e final (valores médios de 674,8% para a MSF e 227,2% para AF, entre os tratamentos) (Tabela 1). Segundo Boeger e Gluzezak (2006), plantas que apresentam menores valores de AFE são mais eficientes em acumular massa seca, e

possuem maior espessura das folhas, o que favorece a fotossíntese. Já a maior AFE indica redução do incremento na densidade foliar, levando plantas com alta AFE a apresentarem espessura foliar reduzida (PINZÓN-TORRES e SCHIAVINATO, 2008). Esse comportamento é decorrente em partes dos atributos químicos dos substratos, que permitiram a nutrição adequada das plantas que foi observado na AF, MSF e MST (Tabela 1) e AFE (Figura 2A).

A razão de área foliar (RAF) apresentou comportamento decrescente quadrático em todos os substratos estudados. Esse índice é determinado por meio da divisão da AF pela MST, demonstrando que entre os substratos avaliados as plantas apresentaram maior acúmulo de MST (666,4 a 748,6%) em relação à área foliar (196,1 a 248,1%) (Tabela 1), o que pode ser explicado pelo maior investimento de fotoassimilados na produção de MSF e no crescimento do sistema radicular, variáveis de elevada importância na averiguação do crescimento de uma planta, na elevação da fotossíntese e na absorção de nutrientes e água.

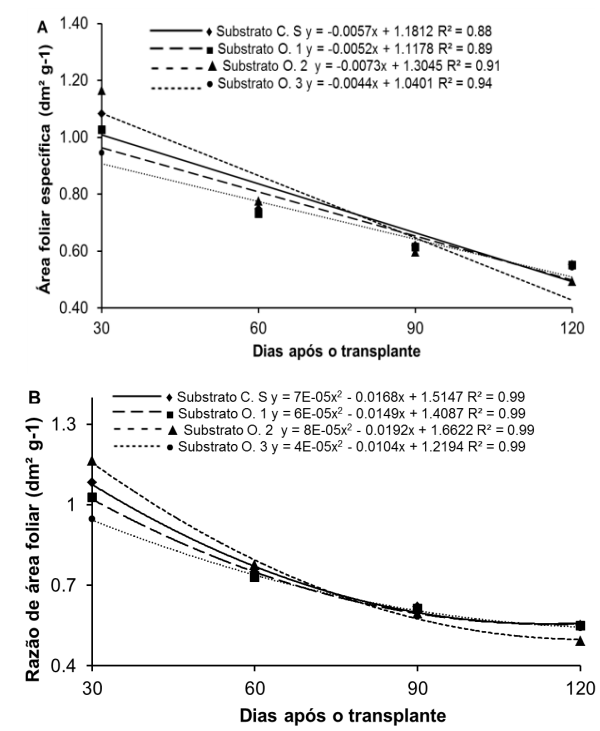


Figura 2. Área foliar específica (A) e razão de área foliar (B) de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd., em função de dias após a primeira avaliação. Função ajustada linear e polinomial quadrática.

A elevação da fotossíntese, bem como, a nutrição e absorção de água são dependentes das características físicas e dos atributos químicos dos substratos, em que ocorre fornecimento satisfatório dos nutrientes e condições físicas estáveis para o crescimento da parte aérea e do sistema radicular, contribuindo com a maior produção dos componentes morfológicos de AF, MSF e MST (Tabela 1). Outro fator a ser observado é o pH, que regula a disponibilidade dos nutrientes influenciando a nutrição da planta. Malavolta (1979), propôs a tabela de disponibilidade dos nutrientes em função do pH, e afirma que valores inferiores a 6,0 propiciam redução na disponibilidade



dos macronutrientes e aumento na dos micronutrientes. No entanto Kämpf (2005), afirma que em substratos orgânicos o pH deve ser de 5,2 a 5,5, devido a necessidade de maior atividade dos microorganismos na mineralização da matéria orgânica e, conforme os valores apresentados por Gonçalves et al. (2019) as composições dos substratos possuem valores próximos ao recomendado.

A RAF é um índice morfológico que avalia a razão de área foliar usada para produzir uma unidade de massa seca expressa em  $\text{cm}^2\text{g}^{-1}$ , variando em função da AFE (PINZÓN-TORRES e SCHIAVINATO, 2008), servindo como método de averiguação de efeitos dos genótipos, do clima e de manejo sobre o crescimento de uma determinada planta. O decréscimo da RAF pode indicar maior acúmulo de MST, como verificado neste trabalho (Tabela 1 e Figura 1C), sendo favorável ao crescimento da planta e a sobrevivência a campo. Para Peixoto et al. (2011) o declínio da RAF é normal e ocorre conforme a planta cresce, demonstrando a redução da área foliar útil para fotossíntese, que é responsável pela interceptação da radiação luminosa e captação do  $\text{CO}_2$  para a produção de massa seca. Desta forma, a área foliar varia com a AFE e MSF, em que qualquer variação eventual que ocorra individualmente com uma ou mesmo com as duas, pode refletir diretamente na RAF, alterando o comportamento fisiológico da planta.

A máxima taxa assimilatória líquida TAL para mudas de *D. odorata* foi obtida de plantas que cresceram no substrato T1, seguido do T2, T3 e T4 aos 30 dias, e após ocorreu decréscimo linear até os 120 dias (Figura 3B). A TAL expressa à matéria seca produzida por unidade de área foliar por unidade de tempo em  $\text{g}^{-1}\text{dm}^{-2}\text{dia}^{-1}$ , estando o aumento da TAL relacionado com o acúmulo de biomassa na planta. Contudo, sua redução não indica que a planta não acumulou biomassa, e que a divergência dessa variável pode ser justificada pelas variações intra-específicas da TAL (RODRIGUES et al., 1993), e pela ecologia da espécie *D. odorata*, planta classificada no estágio de sucessão ecológica como clímax pouco exigente em luz. Segundo Whitmore (1990), as plantas clímax apresentam crescimento lento e determinado, folhas de vida-longa e taxa de fotossíntese baixa, ocasionando menor eficiência fotossintética, mesmo em condições ideais de desenvolvimento. No entanto fica evidente por meio dos dados de massa seca (Figura 1C) que a espécie *D. odorata* não reduziu a produção de massa seca frente à redução da TAL, demonstrando a eficiência na utilização da fotossíntese para produção de fotoassimilados e manutenção das funções fisiológicas e do crescimento.

A taxa de crescimento relativa TCR é utilizada para calcular o aumento em matéria orgânica de um intervalo no tempo, nesse caso a cada 30 dias e a MST é indispensável para o cálculo deste índice, então o decréscimo contínuo da TCR é explicado em partes pelo aumento constante da MST, e os substratos que apresentaram menor variação no decréscimo da TAL e TCR (SO2 e SO3) são os que apresentaram maiores valores de AF nas avaliações até os 60 dias, assim, a maior expansão de área para realização da fotossíntese parece estabilizar o decréscimo da TAL e TCR, pelo fato

destes índices considerarem a alocação de massa sobre a massa já existente, de forma a ficar proporcional ao tamanho da planta e da capacidade de realizar fotossíntese.

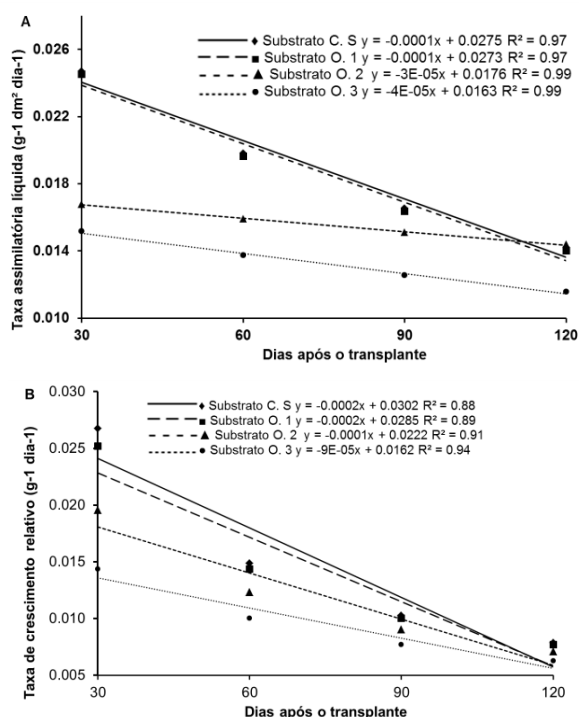


Figura 3. Taxa assimilatória líquida (A) e taxa de crescimento relativo (B) de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd., em função de dias após a primeira avaliação. Função ajustada linear.

## 4 | CONCLUSÃO

Os substratos orgânicos contendo as composições de casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + esterco equino (3:7) e casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + esterco equino + casca de café (1:1:1), apresentaram os melhores índices de crescimentos, podendo substituir o substrato comercial Vivatto Plus® na produção de mudas de *Dipteryx odorata*.

## REFERÊNCIAS

ARAÚJO, A.C.; DANTAS, M.K.L.; PEREIRA, W.E.; ALOUFA, M.A.I. Utilização de substratos orgânicos na produção de mudas de mamoeiro Formosa. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v.8, n.1, p.210-216, 2013.

BARBIERI, D.J.; BRAGA, L.F.; SOUSA, M.P.; ROQUE, C.G. Análise de crescimento de *Bixa orellana* L. sob efeito da inoculação micorrízica e adubação fosfatada. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, n.2, p.129-138, 2011.

BENINCASA, M.M.P. **Análise do Crescimento de Plantas (noções básicas)**. 2.ed. Jaboticabal. FUNEP, 2004. 42p.

BOEGER, M.R.T.; GLUZEZAK, R.M. Adaptações estruturais de sete espécies de plantas para as condições ambientais da área de dunas de Santa Catarina, Brasil. **Iheringia Série Botânica**, Porto Alegre, v.61, n.1-2, p.73-82, 2006.

CALDEIRA, M.V.W.; SCHUMACHER, M.V.; BARICHELLO, L.R.; VOGEL, H.L.M.; OLIVEIRA, L.S. Crescimento de mudas de *Eucalyptus saligna* Smith. em função de diferentes doses de vermicomposto. **Floresta**, Curitiba, v.28, n.1-2, p.19-30, 2000.

CARVALHO, P.E.R. **Cumaru-ferro** *Dipteryx odorata*. EMBRAPA, Comunicado técnico 225, Colombo, 2009, p7.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Centro Nacional de Pesquisa de Solos, Manual de Métodos de Análise de Solos**. 2.ed. Rio de Janeiro, Embrapa, 1997. 212p.

FERREIRA, D.F. Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FREITAS, A.F.; SOUZA, L.A.G.; CARDOSO, I.M.; PAIVA, H.N. Fino de carvão vegetal em substrato para produção de mudas de *Dipteryx odorata*. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v.9, n.3, p.31-40, 2014.

GONÇALVES, G.S.; BRAGA, L.F.; CUNHA, L.Q. de S. Análise do crescimento de mudas de *Jacaratia spinosa* (Aubl.) A. DC. (Caricaceae) em substratos orgânicos compostos com resíduos de casca de amêndoas de castanha-do-Brasil. In:

OLIVEIRA de FRANCISCO, A.L. **Botânica aplicada 2**. Vol.2, Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2019. p.1-15

GONÇALVES, J.L.M.; POGGIANI, F. Substratos para produção de mudas florestais. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DO SOLO, 13., Águas de Lindóia, 1996. **Anais...** Piracicaba, Sociedade Latino Americana de Ciência do Solo, 1996. CD-Rom.

KÄMPF, A.N. **Produção comercial de plantas ornamentais**. Guaíba: Agrolivros, 2005, 256p.

MALAVOLTA, E. **ABC da Adubação**. 4.ed. São Paulo-SP: Editora Agronomia Ceres, 1979. 255p.

MARANHO, Á.S.; PAIVA, A.V.; PAULA, S.R.P. Crescimento inicial de espécies nativas com potencial madeireiro na Amazônia, Brasil. *Revista Árvore*, Viçosa, v.37, n.5, p.913-921, 2013.

PEIXOTO, C.P.; CRUZ, T.V.; PEIXOTO, M.F.S.P. Análise quantitativa do crescimento de plantas: conceitos e prática. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.7, n.13, p.51-76, 2011.

PES, L.Z.; ARENHARDT, M.H. **Fisiologia Vegetal**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2015, 81p.

PINTO, A.M.; MORELLATO, L.P.C.; BARBOSA, A.P. Fenologia reprodutiva de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd (Fabaceae) em duas áreas de floresta na Amazônia Central. **Acta Amazônica**, Manaus, v.38, n.4, p.643-650, 2008.

PINZÓN-TORRES, J.A.; SCHIAVINATO, M.A. Crescimento, eficiência fotossintética e eficiência do uso da água em quatro espécies de leguminosas arbóreas tropicais. **Hoehnea**, São Paulo, v.35, n.3, p.395-404, 2008.

RODRIGUES, J.D.; RODRIGUES, S.D.; DELACHIAVE, M.E.A.; PEDRAS J.F.; BOARO, C.S.F. Influência de diferentes níveis de cálcio em plantas de estilosantes (*Stylosanthes guyanensis* (Aubl.) Sw. CV. Cook), avaliados através de alguns parâmetros fisiológicos. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v.50, n.1, p.45-57, 1993.

TRAZZI, P.A.M.; CALDEIRA, V.W.; PASSOS, R.R.; GONÇALVES, E.O. Substratos de origem orgânica

para produção de mudas de Teca (*Tectona grandis* Linn. F.). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.23, n.3, p.401-409, 2013.

VIEIRA, C.R.; WEBER, O.L.S.; SCARAMUZZA, J.F. Estudo de resíduos orgânicos para produção de mudas de paricá. **Revista de Ciências Ambientais**, Canoas, v.8, n.2, p.47-60, 2014.

WHITMORE, T.C. Tropical Rain Forest dynamics and its implications for management. In: GOMESPOMPA, A.; WHITMORE, T.C.; HADLEY, M. **Rain forest regeneration and management**. Paris, UNESCO and The Part Eeon Publishing Group, 1990. p.67-89.

## SUBSTRATOS ORGÂNICOS NO CRESCIMENTO DE MUDAS DE *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd. (Fabaceae)

**Givanildo Sousa Gonçalves**

Instituto Federal de Mato Grosso - IFMT.  
Confresa-MT

**Lúcia Filgueiras Braga**

Universidade do Estado de Mato Grosso –  
UNEMAT, Faculdade de Ciências Biológicas  
e Agrárias. Laboratório de Ecofisiologia e  
Propagação de Plantas. Alta Floresta-MT

**Letícia Queiroz de Souza Cunha**

Secretaria de Educação do Estado de Mato  
Grosso - SEDUC. Matupá-MT

**RESUMO:** A utilização de substratos orgânicos em substituição aos convencionais na produção de mudas de espécies florestais torna-se viável devido às adequadas características físicas, químicas e biológicas. Este trabalho teve como objetivo analisar o desenvolvimento de mudas de *Dipteryx odorata*, em diferentes composições de substratos contendo resíduos das cascas de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e oito repetições, cada repetição composta pela média de quatro plantas crescidas em tubetes de 50 cm<sup>3</sup>. Os tratamentos constituíram de SC: substrato comercial Vivatto Plus®; SO1: casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + casca arroz carbonizada (3:7); SO2: casca de

amêndoas de castanha-do-Brasil + esterco equino (3:7); SO3: casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + esterco equino + casca café (1:1:1). Foi realizada avaliação inicial, 28 dias após o transplante, e aos 30, 60, 90, 120 dias, sendo mensuradas as variáveis diâmetro de coleto, altura de planta, número de folhas, área foliar, massa seca de folha, aérea, de raiz e total, relação H/D, relação MSA/MSR e índice de qualidade de Dickson IQD. O substrato orgânico composto por cascas de castanha-do-Brasil + esterco de equino + casca de café (1:1:1), possibilita a produção de mudas de *Dipteryx odorata* com qualidade satisfatória, podendo ser levadas à campo após 60 dias de crescimento em viveiro. Todos os substratos orgânicos estudados foram adequados para a produção de mudas de *D. odorata* com qualidade suficiente para substituir o substrato comercial Vivatto Plus®.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cumaru, castanha-do-Brasil, esterco equino, casca de arroz, produção de mudas, recursos naturais.

### ORGANIC SUBSTRATES IN THE GROWTH OF *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd. (Fabaceae)

**ABSTRACT:** The use of organic substrates instead of conventional substrates in the production of seedlings of forest species becomes feasible due to the appropriate physical,

chemical and biological characteristics. This work aimed to analyze the development of *Dipteryx odorata* seedlings in different substratum compositions containing residues of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). The experimental design was completely randomized with four treatments and eight replicates, each replicate composed of the average of four plants grown in 50 cm<sup>3</sup> tubes. The treatments consisted of SC: commercial substrate Vivatto Plus®; SO1: Brazil nut nutshell + charcoal rice husk (3: 7); SO2: Brazil nut nutshell + equine manure (3: 7); SO3: Brazil nut nutshell + equine manure + coffee husk (1: 1: 1). The initial evaluation, 28 days after the transplant, and at 30, 60, 90, 120 days, were measured, collecting diameter, plant height, leaf number, leaf area, dry leaf mass, aerial, root and total, H / D ratio, MSA / MSR ratio and Dickson IQD quality index. The organic substrate composed of Brazil nuts + equine manure + coffee husk (1: 1: 1), allows the production of satisfactory quality *Dipteryx odorata* seedlings, which can be taken to the field after 60 days of growth in nursery. All organic substrates studied were suitable for the production of *D. odorata* seedlings of sufficient quality to replace the commercial Vivatto Plus ® substrate.

**KEYWORDS:** Cumaru, Brazil nut, equine manure, rice husk, production of seedlings, natural resources.

## 1 | INTRODUÇÃO

Entre as espécies florestais nativas do bioma Floresta Amazônica tem-se *Dipteryx odorata* Aubl. Willd., também conhecida como cumarurana, cumaru-verdadeiro, cumaru-amarelo, cumaru de-folha-grande, muimapagé, champagne, cumaru-do-amazonas, cumbaru e cumaru-de-cheiro. As árvores desta espécie chegam à altura de 40 m, com diâmetro a altura do peito de 1,5 m. Apresenta desenvolvimento lento com produção de madeira aproximada de 4,25 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> aos 11 anos, sendo classificada no grupo de sucessão ecológica como planta clímax, com ocorrência no Estado de Mato Grosso em solos de baixa fertilidade (CARVALHO, 2009).

A espécie tem aplicação para a serraria, utilizada como vigas, caibros, ripas, tacos e tábuas para assoalhos, laminados decorativos, móveis, torneados, carroçaria, carpintaria, marcenaria, tanoaria, estacas, esteios, macetas, cabos de ferramentas, batêntes de portas, buchas de eixo de hélices de embarcações navais e outros (CARVALHO, 2009). Possui potencial para a indústria do carvão devido à excelente qualidade da madeira para a carbonização (NISGOSKI et al., 2012). Apresenta emprego na medicina popular (BESSA et al., 2001), sendo extraído da semente a cumarina, óleo muito importante para a indústria farmacêutica (FREITAS et al., 2014).

A utilização de *D. odorata* na recuperação de áreas degradadas é relatada por diversos autores (PINTO et al., 2008; SOUZA et al., 2008; SOUZA et al., 2010), além de ser empregada em reflorestamentos e enriquecimento florestal, frutificando precocemente aos quatro anos de idade (PINTO et al., 2008). Nessa fase tem-se a qualidade das mudas produzidas como um dos principais pontos determinantes



no sucesso do reflorestamento (HERNANDEZ et al., 2013). Para se obter mudas de qualidade é imprescindível que além das sementes e do recipiente, o substrato seja adequado, garantindo condições possíveis à germinação e o enraizamento, estando esses processos ligados às características químicas, físicas e biológicas do substrato (CALDEIRA et al., 2000). A composição do substrato torna-se o fator chave na obtenção de mudas precoces com índices de crescimento elevados, visando também a utilização de insumos de baixo custo e fácil aquisição (TRAZZI et al., 2012).

A utilização de componentes orgânicos provenientes de processos produtivos primários torna-se uma alternativa viável com o objetivo de conferir melhoria nos atributos químicos, físicos e biológicos dos substratos (DELARMELINA et al., 2014).

As cascas das amêndoas da castanha-do-Brasil (*Bertholetia excelsa* H.B.K, Lecythidaceae) constituem um material descartado do beneficiamento da castanha, por ser considerado resíduo. Esse material, oriundo de uma espécie tão nobre poderia ser valorizado, se deixasse de ser um subproduto, e se torna-se matéria-prima para obtenção de novos produtos. Nesse sentido, uma alternativa para utilização do subproduto do beneficiamento da castanha seria a produção de substrato para desenvolvimento de mudas, reduzindo os custos de produção, o que para o produtor de mudas é considerado fundamental no reflorestamento de áreas degradadas, tornando-o competitivo no mercado.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento de mudas de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd. em composições de substratos contendo cascas de amêndoas de castanha-do-Brasil (*Bertholetia excelsa*), casca de café, esterco equino e casca de arroz carbonizada.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no viveiro florestal Flora Ação mudas e Reflorestamento LTDA, localizado no município de Alta Floresta Estado de Mato Grosso sob as coordenadas geográficas 56°01'88" W e 09°54'70" S. Segundo Köppen-Geiger (1928), o clima da região é definido como tropical de monções Am, com temperatura média anual de 26 °C e precipitação anual em torno de 3000 mm.

O viveiro de propagação de plantas possuía cobertura com tela de polietileno preta, com 50% de capacidade de interceptação da luminosidade, e sobre a tela de polietileno uma camada de filme plástico para estufa. As laterais foram fechadas pelas mesmas telas da cobertura. O sistema de irrigação por nebulização acionava automático, três vezes ao dia 7:00, 12:00 e 16:00 horas, aplicando uma lamina de 3 mm de água em 15 minutos.

As sementes de *Dipteryx odorata* (Aubl. Willd Fabaceae) foram coletadas no município de Colíder-MT. Após 90 dias da colheita 1500 sementes foram semeadas com tegumento, sendo dispostas em uma única camada à profundidade de 5 cm,

em canteiro com dimensões de 1x3x0,2 m (largura x comprimento x profundidade) contendo areia grossa. Aos 28 dias após a semeadura, as sementes com protrusão de raiz mínima de 0,2 cm e máxima de 10 cm, foram retiradas do canteiro e transplantadas para tubetes de 50 cm<sup>3</sup>, contendo as diferentes composições de substratos.

Os resíduos do tegumento externo das amêndoas da castanha-do-Brasil conhecidos como cascas, foram triturados em triturador forrageiro GT 2.000 L, 2,0 CV, marca Garthen regulado para tamanho de partículas com até 12 mm e colocados para decomposição por cinco meses. Durante a decomposição, foi realizado o umedecimento e revolvimento dos resíduos, duas vezes por semana. A casca de café e o esterco equino foram obtidos de produtores locais e já estavam curtidados por dois meses. As cascas de arroz carbonizadas foram utilizadas após resfriamento.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e oito repetições, cada repetição foi constituída pela média de quatro plantas, totalizando 32 plantas por tratamento. Os tratamentos foram: SC-substrato comercial Vivatto Plus®; SO1: substrato orgânico casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + casca arroz (3:7); SO2: substrato orgânico casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + esterco equino (3:7); SO3: substrato orgânico casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + esterco equino + casca café (1:1:1). A cada composição de substrato utilizado foi adicionado adubo de liberação controlada (Osmocote 14-14-14) na proporção de 5 kg m<sup>3</sup>.

A cada composição de substrato utilizado foi adicionado adubo de liberação controlada (Osmocote 14-14-14) na proporção de 5 kg m<sup>3</sup> de substrato. A análise química dos substratos foi realizada seguindo a determinação do manual de métodos oficiais para análise de resíduos orgânicos MAPA IN SDA 28. De todos os substratos testados foram determinados os teores de nitrogênio nitrato e amônio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, boro, sódio, cobre, ferro, mangânes, zinco, pH e condutividade elétrica (EC) de todos os substratos. Para a obtenção dos teores totais dos nutrientes contidos nas formulações foi realizada a soma dos nutrientes dos substratos, com os contidos no adubo de liberação controlada.

As características físicas foram determinadas, de acordo com Embrapa (1997), sendo elas: densidade de partículas (Dp), densidade global (Dg), macroporosidade (Ma), microporosidade (Ma), porosidade Total (PT), umidade gravimétrica (UG), umidade volumétrica (UV), capacidade de retenção de água dos substratos (CRA).

Aos 25 dias após o transplante, foi realizada a avaliação inicial das plantas de *A. mucosa* e consecutivamente aos 30, 60, 90, 120, 150 dias após a primeira avaliação, sendo mensuradas as variáveis: diâmetro de coleto (DC), altura de planta (AP), número de folhas (NF), área foliar (AF), massa seca de folha (MSF), massa seca da parte aérea (MAS), massa seca de raiz (MSR), massa seca total (MST), relação entre altura de parte aérea (cm) e diâmetro do coleto (mm) (H/D), relação entre a massa seca da parte aérea (g) e massa seca da raiz (g) (MAS/MSR) e índice de qualidade de Dickson (IQD).

As médias foram submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey a 5%, utilizando o recurso computacional SISVAR, versão 4.0 (FERREIRA, 2011). Em seguida as médias foram submetidas à regressão, sendo escolhidos os modelos significativos que apresentaram valores de correlação  $\geq 0,5$ .

### 3 | RESULTADO E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 encontram-se os resultados da análise física dos substratos avaliados na produção de mudas de *D. odorata*, onde se observa que todos apresentam valores adequados de macroporosidade (Ma), de acordo com a classificação de Gonçalves e Poggiani (1996) (Anexos, Tabela 1), com médias entre 35-45 %. A porosidade total foi considerada adequada (75-85% para os substratos SC, SO1 e SO2, enquanto SO3 apresentou valor médio entre 55-75 %).

Adensidade global e microporosidade apresentaram valores considerados médios para todos os substratos (Tabela 1), com base em Gonçalves e Poggiani (1996), a alta densidade dos substratos normalmente ocasiona compactação, devido a redução da Ma e PT (FERRAZ et al., 2005), o que não ocorreu, já que Ma foi adequada para todos os substratos e PT também, exceto para SO3 que atingiu valor médio.

A umidade volumétrica apresentou maiores valores para os substratos SC e SO2 (Tabela 1), e este último também com valores mais elevados de capacidade de retenção de água (42,36 mL por 20 g<sup>-1</sup> de substrato), porém todos os substratos apresentaram CRA superior ao estabelecido como adequado por Gonçalves e Poggiani (1996).

Subs- tratos	Dp --- g <sup>-1</sup> cm <sup>3</sup> ---	Dg	Ma	Mi	PT	UV	UG	CRA --mL--
			-----%	-----				
SC	1,497	0,311	39,172	41,103	80,275	0,339	1,220	36,543
SO1	1,152	0,283	37,753	40,110	77,866	0,283	1,152	37,753
SO2	1,276	0,316	42,360	40,293	82,656	0,316	1,276	42,360
SO3	1,255	0,260	44,056	29,543	73,603	0,260	1,255	44,056

Tabela 1. Densidade das partículas (Dp), densidade global (Dg), macroporosidade (Ma), microporosidade (Mi), porosidade total (PT), umidade volumétrica (UV), umidade gravimétrica (UG) e capacidade máxima de retenção de água (CRA) de diferentes substratos utilizados na produção de mudas de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd.

Metódo de determinação EMBRAPA (1997). UV= m<sup>3</sup> água/ m<sup>3</sup> substrato; UG= Kg água/Kg substrato. SC – substrato comercial, SO1 – substrato orgânico casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + casca arroz (3:7), SO2 – substrato orgânico casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + esterco equino (3:7), SO3 – substrato orgânico casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + esterco equino + casca café (1:1:1).

A análise química demonstrou que os substratos SC e SO2 apresentaram maiores teores de Ca, Mg e S, enquanto SO2 e SO3 apresentaram maiores valores de P e K (Tabela 3). Contudo, após a adição do adubo de liberação controlada os teores de N, P e K ficaram mais elevados e próximos entre os diferentes substratos.

Substratos	Macronutrientes nos substratos (mg <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )							*Macronutrientes nos substratos com adubo liberação controlada (mg <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )		
	Ca	Mg	S	N-Nitrato	N-Amônio	P	K	N-Total	P	K
SC	200,8	75,6	253,7	89,7	9,8	3,9	238,5	799,5	309,9	821,5
SO1	1,4	0,6	3,9	15,8	2,5	8,1	41,5	718,3	314,1	624,5
SO2	106,8	33,9	11,0	91,8	7,4	29,6	76,6	799,2	335,6	659,6
SO3	18,2	10,3	7,1	77,4	11,2	19,9	200,9	788,6	325,9	783,9

Tabela 2. Resultados da análise química dos macronutrientes nos substratos utilizados na produção de mudas de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd.

Determinação pelo manual de métodos oficiais MAPA IN SDA 28. \* Valores obtidos pela soma dos macronutrientes contidos nos substratos com os obtidos no adubo de liberação controlada. SC – substrato comercial, SO1 – substrato orgânico casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + casca arroz (3:7), SO2 – substrato orgânico casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + esterco equino (3:7), SO3 – substrato orgânico casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + esterco equino + casca café (1:1:1).

Os substratos SO1 e SC apresentaram os maiores valores de pH e o SO2 o menor. A EC do SC foi superior a de todos os demais e no SO1 registrou-se a menor. O SC apresentou os maiores teores de Na e de Mn e SO1 de Fe e Zn.

Substrato	pH	EC dS m <sup>-1</sup>	B	Na	Cu Fe Mn Zn				
					mg <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>				
SC	5,5	3,0	1,6	124,8	0,01	0,05	1,0	0,20	
SO1	5,8	0,2	0,1	1,1	0,01	1,10	0,1	2,20	
SO2	4,6	1,0	0,1	4,1	0,03	0,10	0,6	0,20	
SO3	5,0	0,8	0,1	2,7	0,03	0,40	0,1	0,05	

Tabela 3. Resultados da análise de condutividade elétrica, pH, sódio e micronutrientes nos substratos utilizados na produção de mudas de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd.

Determinação pelo manual de métodos oficiais MAPA IN SDA 28. SC – substrato comercial, SO1 – substrato orgânico casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + casca arroz (3:7), SO2 – substrato orgânico casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + esterco equino (3:7), SO3 – substrato orgânico casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + esterco equino + casca café (1:1:1).

As plantas de *D. odorata* que cresceram nos substratos SC, SO1 e SO3 apresentaram diâmetro de coleto semelhante estatisticamente após 120 dias do transplante. Não foi observado diferença estatística aos 30, 60 e 90 dias de avaliação (Tabela 2). A análise de regressão dos resultados do diâmetro do coleto ao longo dos 120 dias de avaliação indica que não houve aumento da variável aos 30 e 60 dias após o transplante, somente aos 90 e 120 dias nota-se crescimento (Figura 1A). O diâmetro do coleto é um dos mais importantes indicadores da qualidade de mudas, e representa a capacidade de sobrevivência após o plantio, devendo essa variável ser superior a 2 mm (DANIEL et al., 1997). Desta forma, em todos os tratamentos, o diâmetro do coleto foi superior ao estabelecido por estes autores.

As maiores médias de altura das plantas de *D. odorata* aos 30 dias foram registradas nos substratos SO1, SO2 e SO3, e aos 60 dias nas plantas crescidas

nos substratos SC, SO2 e SO3. Não se observou diferença significativa entre os substratos nas avaliações aos 90 e 120 dias após o transplante (Tabela 2). Na análise de regressão constata-se que ocorreu aumento linear na altura das plantas em todos os substratos avaliados (Figura 1B). A mensuração da altura de plantas é importante na averiguação da qualidade de mudas, sendo imprescindível sua consideração como indicador do momento de retirada da muda do viveiro para o plantio (GOMES et al., 2002). As médias de altura das plantas mantidas no SO3 aos 30 e 60 dias, e de diâmetro aos 120 dias, são as maiores nos tratamentos, indicando que este substrato parece ter fornecido condições adequadas para o crescimento ao longo de todo o período de avaliação.

Substratos	Dias após o transplante					
	AI <sup>ns</sup>	30 <sup>ns</sup>	60 <sup>ns</sup>	90 <sup>ns</sup>	120 <sup>**</sup>	
Diâmetro de coleto (mm)						
SC	3,95	3,64	3,52	3,94	4,79	a
SO1	3,92	3,25	3,38	3,83	4,61	a
SO2	3,95	3,29	3,45	3,94	4,04	b
SO3	3,91	3,41	3,54	3,96	4,41	ab
CV(%)	5,60	9,58	7,24	7,29	7,38	
Substratos	Altura das plantas (cm)					
	AI <sup>ns</sup>	30 <sup>*</sup>	60 <sup>*</sup>	90 <sup>ns</sup>	120 <sup>ns</sup>	
SC	10,75	13,21	b	19,02	ab	25,18
SO1	10,90	16,47	a	17,71	b	19,34
SO2	10,95	15,72	ab	20,37	ab	21,08
SO3	10,80	16,12	a	20,45	a	21,33
CV(%)	8,78	12,72	10,12	27,14	9,46	

TABELA 4. Valores médios de diâmetro do coleto e altura das plantas de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd, em função de diferentes composições de substratos orgânicos.

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. \* significativo a 5%; \*\* significativo a 1%; <sup>ns</sup> não significativo. AI – avaliação inicial. SC – substrato comercial, SO1 – substrato orgânico casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + casca arroz (3:7), SO2 – substrato orgânico casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + esterco equino (3:7), SO3 – substrato orgânico casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + esterco equino + casca café (1:1:1).

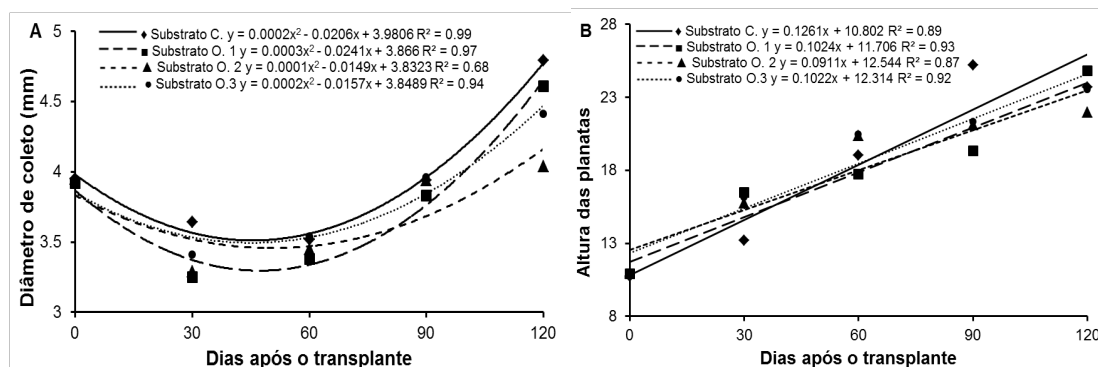


Figura 1. Diâmetro do coleto (A) e altura das plantas (B) de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd, em função de dias após a primeira avaliação. Função ajustada linear e polinomial quadrática. Significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.



Para número médio de folhas por planta de *D. odorata*, não foi observado diferença significativa entre os substratos em nenhum período de avaliação (Tabela 5). Em todos os tratamentos ocorreu aumento linear do número de folhas das plantas (Figura 2A). Considerando que o número de folhas por planta é um indicador de qualidade das mudas, relacionando-se diretamente com o acúmulo de massa pela planta, e cuja massa seca e área foliar são dependentes desta variável (CÂMARA e ENDRES, 2008), entende-se que todos os substratos avaliados permitiram crescimento adequado das plantas, podendo substituir o substrato comercial.

As plantas de *D. odorata* crescidas nos substratos SC, SO2 e SO3 apresentaram os maiores valores de área foliar aos 60 dias. Não foi observado diferença estatística significativa nas avaliações aos 30, e 90 dias. Aos 120 dias nos substratos SC, SO1 e SO3 registraram-se as maiores médias de área foliar (Tabela 5). A análise da regressão evidencia que as plantas que cresceram nos substratos SO2 e SO3 apresentaram maior área foliar até 90 dias e posterior redução. Nos demais substratos ocorreu aumento crescente da área foliar (Figura 2B).

A área foliar das plantas está diretamente ligada à produtividade vegetal, responsável pela captação da radiação e conversão em energia orgânica, tendo elevada importância na avaliação do desenvolvimento das mudas produzidas em viveiros (ARAÚJO et al., 2013). Assim, os resultados de área foliar aos 120 dias indicam que os maiores valores ocorreram nos tratamentos SC, SO1 e SO3, mesmo sem ocorrer diferenças entre o número de folhas das plantas dos diferentes tratamentos (Tabela 5), indicando que com o mesmo número de folhas, as condições propiciadas pelas características físicas (Tabela 1) e químicas (Tabelas 2 e 3) são adequadas ao crescimento das mudas de *D. odorata*. As características físicas de relativa importância no crescimento das mudas foram sem dúvida a Ma, Mi, PT, Dg e CRA. Destas a CRA tem relação direta com a expansão da área foliar, devido à água entre outras funções fornecer elétrons para o fotossistema II da fotossíntese. Assim, o fornecimento de água entre 36,5-44,0 mL por 20 cm<sup>-3</sup> em todos os substratos (Tabela 1) contribuiu com o aumento da AF.

Os substratos ao qual se observou as maiores áreas foliares aos 120 dias (SC e SO3), foram os mesmos verificados nas variáveis diâmetro de coleto aos 120 dias e altura das plantas aos 60 dias (Tabela 4). Entre os fatores que podem ter contribuído para esse resultado, acredita-se que, o pH dos respectivos tratamentos (5,5 e 5,0) (Tabela 3) foram adequados a disponibilidade dos nutrientes. A tabela de disponibilidade dos nutrientes propostas por Malavolta (1979), revela que em solos com pH inferior a 6,0 ocorre redução na disponibilidade de N, S, B, K, Ca, Mg, Cl, Mo e aumenta a disponibilidade de Al, Fe, Mn, Co e Zn. Contudo, em substratos orgânicos o pH deve ser naturalmente menor que em solos, pois a atuação dos microorganismos na decomposição da matéria orgânicos geram ácidos flúvicos e húmicos, ácidos orgânicos, ácido tânico e outros. Assim, o pH dos substratos SC e SO3 apresentaram relação



adequado entre decomposição da matéria orgânica e disponibilidade de nutrientes.

Substratos	Dias após o transplante						
	AI <sup>ns</sup>	30 <sup>ns</sup>	60 <sup>ns</sup>	90 <sup>ns</sup>	120 <sup>ns</sup>		
	Número de folhas por planta						
SC	2,00	2,72	4,03	4,12	5,31		
SO1	2,00	2,87	3,78	3,82	4,67		
SO2	2,00	3,06	3,91	3,94	4,44		
SO3	2,00	3,00	3,93	3,91	4,91		
CV(%)	0,00	13,98	13,50	12,25	13,34		
Substratos	Área foliar (cm <sup>2</sup> )						
	AI <sup>ns</sup>	30 <sup>ns</sup>	60 <sup>*</sup>	90 <sup>ns</sup>	120 <sup>**</sup>		
SC	73,86	102,9	138,99	ab	161,43	183,29	a
SO1	73,74	103,0	124,10	b	142,61	180,15	a
SO2	75,82	123,7	147,23	ab	144,65	148,72	b
SO3	74,73	119,3	157,73	a	156,45	164,72	ab
CV(%)	10,14	18,76	15,93	17,76	9,98		

TABELA 5. Valores médios de número de folhas e área foliar de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd, em função de diferentes composições de substratos orgânicos.

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. \* significativo a 5%; \*\* significativo a 1%; <sup>ns</sup> não significativo. AI – avaliação inicial. SC – substrato comercial, SO1 – substrato orgânico casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + casca arroz (3:7), SO2 – substrato orgânico casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + esterco equino (3:7), SO3 – substrato orgânico casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + esterco equino + casca café (1:1:1).

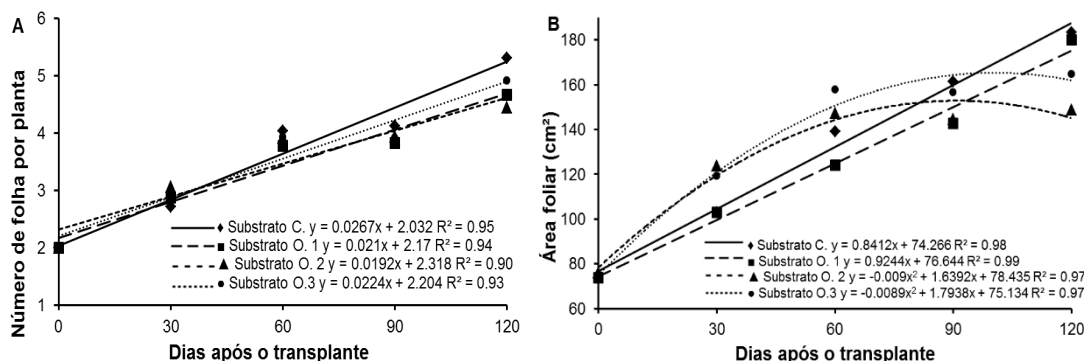


Figura 2. Número de folhas (A) e Área foliar (B) de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd, em função de dias após a primeira avaliação. Função ajustada linear e polinomial quadrática. Significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

As maiores médias de massa seca das folhas (MSF) de *D. odorata* foram obtidas de plantas que cresceram nos substratos SC, SO2 e SO3 na avaliação aos 60 dias e SC, SO1 e SO3 aos 120 dias. Não se registrou diferença significativa entre os substratos nas avaliações aos 30 e 90 dias após o transplante (Tabela 6). Constata-se pela análise de regressão, que ocorreu aumento linear da MSF em todos os substratos, ao longo dos 120 dias (Figura 3A).

Os substratos ao qual se observou os maiores valores de MSF na avaliação aos 120 dias (SC, SO1 e SO3) são os mesmos em que se registrou maior área foliar. A maior produtividade ocorrida para MSF entre os substratos aos 60 e 120 dias após o

transplante se deve provavelmente aos maiores teores de Ca, Mg e S dos SC e SO3, Fe e Zn do SO1 (Tabelas 2 e 3). O fornecimento adequado destes nutrientes garante a realização das funções fisiológicas ao quais estão envolvidos. Entre esses o Ca e Mg possuem relação direta com a MSF, o Ca faz parte da parede celular das células e atua na ativação de enzimas envolvidas na fotossíntese é indispensável na obtenção de plantas robustas com alto potencial fotossintético.

Com relação à massa seca da parte aérea (MSA), os substratos SC, SO2 e SO3 apresentaram-se superiores ao SO1 na avaliação aos 60 dias. Comportamento idêntico observado para MSF aos 60 dias (Tabela 6). Não se registraram diferenças significativas nas avaliações aos 30, 90 e 120 dias. As curvas de regressão lineares indicam aumento progressivo da massa seca aérea das plantas ao longo de todo o período de avaliação, independente do substrato utilizado (Figura 3B). Todos os tratamentos aos 120 dias promoveram o mesmo crescimento da parte aérea, revelando que as características físicas (Tabela 1) e químicas (Tabelas 2 e 3) foram adequadas a todos os substratos. A adição de 5 kg do adubo de liberação controlada por m<sup>-3</sup> de substrato contribuiu para que mudas de *D. odorata* obtivessem DC e AP superior a 4,0 e 21,0 cm (Tabela 4), evidenciando a rusticidade e preparo para plantio a campo.

Os maiores valores de massa seca de raiz (MSR) aos 30 dias após o transplante foram observados nas plantas do substrato SO1, SO2 e SO3. Não se obteve diferença significativa para nenhum outro período de avaliação (Tabela 6). As curvas de regressão lineares demonstram que ocorreu aumento linear e progressivo da massa seca das raízes das plantas de *D. odorata* ao longo dos 120 dias de avaliação (Figura 3C).

Entre os fatores que contribuem para o crescimento do sistema radicular, a estrutura física dos substratos é sem dúvida a de maior importância. A não obtenção de diferença significativa para MSR de mudas de *D. odorata* após 30 dias, se deve principalmente as características físicas de todos os substratos que se mantiveram próximas, com valores médios para Mi e Dg, valores adequados para Ma, PT e valores considerados superiores aos adequados para CRA (Tabela 1). Segundo Haynes e Goh (1978), o aspecto físico mais importante de um substrato é a presença de estrutura porosa, com capacidade de estocar e suprir água para as raízes das plantas. Características físicas que foram alcançadas nas diferentes composições dos substratos orgânicos.

Subs- tratos	Al <sup>ns</sup>	Dias após o transplante					
		30 <sup>ns</sup>	60*	90 <sup>ns</sup>	120*		
Massa seca de folha (mg)							
SC	198,43	551,89	844,19	ab	967,08	1403,62	ab
SO1	194,49	576,70	691,28	b	952,60	1464,68	a
SO2	200,98	626,61	806,13	ab	964,22	1197,85	b
SO3	201,31	650,17	956,41	a	1043,76	1294,23	ab
CV(%)	10,01	19,70	18,68		19,77	13,77	

Substratos	Massa seca aérea (mg)					
	AI <sup>ns</sup>	30 <sup>ns</sup>	60*	90 <sup>ns</sup>	120 <sup>ns</sup>	
SC	370,16	821,31	1311,16	ab	1740,40	2708,11
SO1	377,66	872,91	1091,51	b	1563,51	2625,17
SO2	375,82	826,69	1269,87	ab	1650,82	2479,49
SO3	368,21	979,53	1477,86	a	1872,60	2395,53
CV(%)	13,41	17,28	18,88		20,03	14,37

Substratos	Massa seca de raiz (mg)					
	AI <sup>ns</sup>	30**	60 <sup>ns</sup>	90 <sup>ns</sup>	120 <sup>ns</sup>	
SC	111,26	314,43	b	412,97	967,08	896,14
SO1	116,57	403,67	ab	342,91	952,60	886,05
SO2	115,99	367,57	ab	345,99	964,22	798,06
SO3	107,96	446,66	a	408,35	1043,76	787,38
CV(%)	26,65	17,10	18,76	19,77	20,67	

Substratos	Massa seca total (mg)						
	AI <sup>ns</sup>	30*	60*	90 <sup>ns</sup>	120 <sup>ns</sup>		
SC	481,41	1135,74	b	1724,13	ab	2253,02	3604,25
SO1	494,23	1276,58	ab	1434,41	b	2087,29	3511,23
SO2	491,81	1294,26	ab	1615,87	ab	2226,07	3277,55
SO3	476,17	1426,19	a	1886,22	a	2506,77	3182,91
CV(%)	15,80	16,23	18,36	20,07	15,03		

TABELA 6. Valores médios de massa seca de folha, massa seca aérea, massa seca de raiz e massa seca total de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd., em função de diferentes composições de substratos orgânicos.

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. \* significativo a 5%; \*\* significativo a 1%; <sup>ns</sup> não significativo. AI – avaliação inicial. SC – substrato comercial, SO1 – substrato orgânico casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + casca arroz (3:7), SO2 – substrato orgânico casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + esterco equino (3:7), SO3 – substrato orgânico casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + esterco equino + casca café (1:1:1).

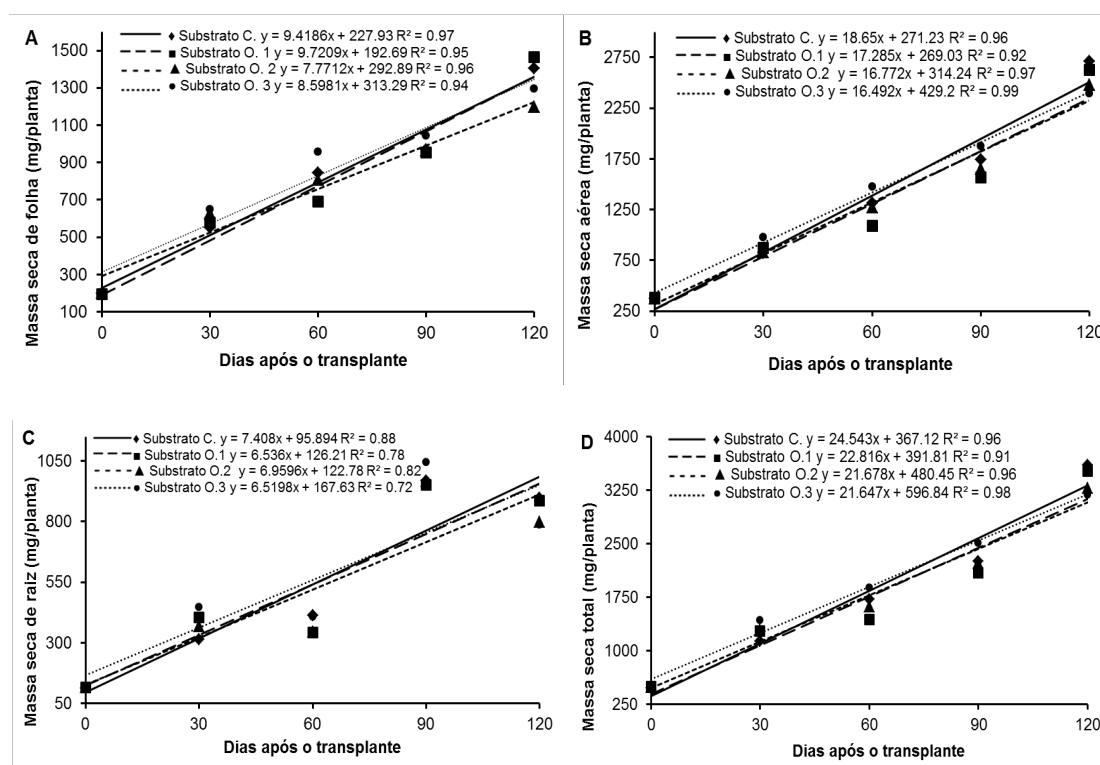


Figura 3. Massa seca de folha (A), massa seca aérea (B), massa seca de raiz (C) e massa seca total (D) de *Dipteryx odorata* (Aubl.), de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd, em função de dias após

a primeira avaliação. Função ajustada linear. Significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Os maiores valores de massa seca total (MST) na avaliação aos 30 dias foram observados nas plantas crescidas nos substratos SO1, SO2 e SO3 e na avaliação aos 60 dias destacaram-se os substratos SC, SO2 e SO3. Não se registraram diferenças significativas nas demais avaliações (Tabela 6). As curvas de regressão lineares demonstram que ocorreu aumento progressivo da MST das plantas de *D. odorata* independente do substrato e do período de avaliação (Figura 3D).

Constatou-se que o substrato SO3 foi o único onde ocorreu maiores valores médios nas variáveis diâmetro de coleto, número de folhas, altura das plantas, AF, MSF, MSR e MST. Acredita-se que a estrutura física adequada Dp, Ma, Mi, PT, UV, UG e CRA do substrato SO3 (Tabela 1) e os atributos químicos Ca, Mg, N, P, K, Zn, B, Fe, pH e EC (Tabelas 2 e 3) tenha influenciando na superioridade do mesmo para as variáveis estudadas.

As plantas de *D. odorata* exibiram relação altura/diâmetro (H/D) significativa nas avaliações aos 30 e 60 dias, com superioridade aos 30 dias nos substratos SO1, SO2 e SO3 e aos 60 dias nos substratos SC, SO2 e SO3. Nas demais avaliações não ocorreu diferença significativa (Tabela 7).

Registrou-se comportamento quadrático para a relação H/D das plantas de *D. odorata* em todos os substratos, com decréscimo aos 90 e 120 dias (Figura 4A), o que possivelmente está relacionado ao aumento em altura das mudas sem ocorrer aumento de mesma intensidade no diâmetro durante estes períodos (Tabela 4, Figuras 1A e 1B).

A relação entre as variáveis H/D é importante para determinar a capacidade de sobrevivência da muda após o plantio no campo (ARTHUR et al., 2007) e determina a robustez da muda, correlacionando o menor índice com a sobrevivência da planta (GOMES e PAIVA, 2006). Os valores obtidos para relação H/D de *D. odorata*, após 60 dias de avaliação estiveram entre 4,99 e 6,81 sendo estes valores semelhantes aos descritos por Freitas et al. (2014) (5,7 a 6,2) para a mesma espécie, concluindo que o índice está de acordo com o crescimento adequado da parte aérea e do diâmetro do coleto. O limite aceitável da relação H/D para se obter mudas de qualidade satisfatória para plantio, estabelecido por Birchler et al. (1998) como inferior a 10. Assim, relações superiores a 5,0 foram registradas a partir dos 60 dias de avaliação nas plantas de todos os substratos (Tabela 7), indicando que a partir deste período as mudas de *D. odorata* já apresentam condições para serem levadas a campo para plantio.

	Dias após o transplante						
	Al <sup>ns</sup>	30 <sup>**</sup>	60 <sup>**</sup>	90 <sup>ns</sup>	120 <sup>ns</sup>		
	Relação H/D						
SC	2,75	3,71	b	5,39	ab	6,81	4,99

SO1	2,83	5,11	a	5,18	b	5,08	5,42
SO2	2,81	4,78	a	5,89	a	5,35	5,59
SO3	2,78	4,77	a	5,79	ab	5,39	5,36
CV(%)	13,75	11,99		6,85		33,96	10,10
Substratos	AI <sup>ns</sup>	30 <sup>ns</sup>		60 <sup>ns</sup>		90 <sup>ns</sup>	120 <sup>ns</sup>
	Relação MSA/MSR						
SC	3,62	2,64		3,37		3,57	3,25
SO1	3,78	2,23		3,25		3,68	3,13
SO2	3,49	2,59		3,76		2,90	3,25
SO3	3,64	2,35		3,74		3,09	3,17
CV(%)	10,24	13,7		10,55		28,33	13,08
Substratos	AI <sup>ns</sup>	30 <sup>ns</sup>		60 <sup>ns</sup>		90 <sup>ns</sup>	120 <sup>ns</sup>
	Índice de Qualidade de Dickson IQD						
SC	0,07	0,18		0,19		0,24	0,45
SO1	0,08	0,17		0,17		0,25	0,42
SO2	0,08	0,18		0,17		0,27	0,39
SO3	0,07	0,20		0,20		0,30	0,38
CV(%)	24,84	14,21		17,36		22,44	19,79

TABELA 7. Valores médios de relação H/D, relação MSA/MSR e índice de qualidade de Dickson IQD de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd, em função de diferentes composições de substratos orgânicos.

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. \* significativo a 5%; \*\* significativo a 1%; <sup>ns</sup> não significativo. AI – avaliação inicial. SC – substrato comercial, SO1 – substrato orgânico casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + casca arroz (3:7), SO2 – substrato orgânico casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + esterco equino (3:7), SO3 – substrato orgânico casca de amêndoas de castanha-do-Brasil + esterco equino + casca café (1:1:1).

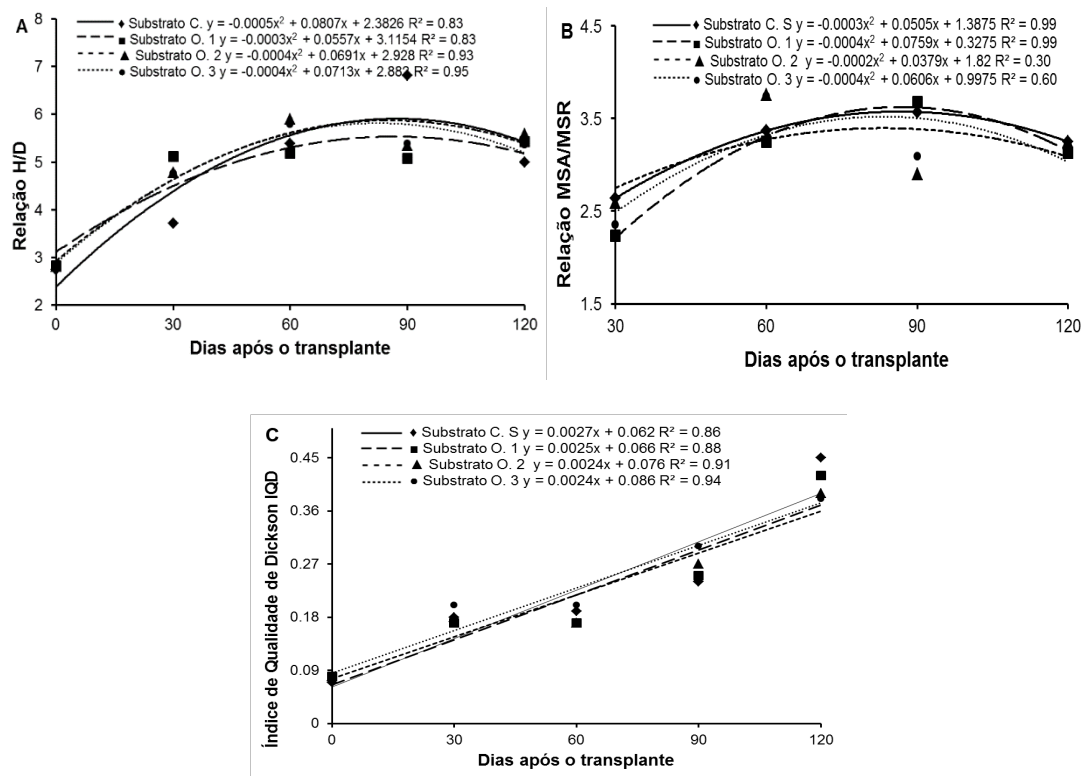


Figura 4. Relação H/D (A), relação MSA/MSR (B) e índice de qualidade de Dickson (IQD) de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd, em função de dias após a primeira avaliação. Função ajustada linear e polinomial quadrática. Significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A relação massa seca aérea/massa seca de raiz (MSA/MSR) das mudas de *D. odorata*, mostrou-se similar para todos os tratamentos em todos os períodos de avaliação (Tabela 7). As curvas de regressões quadráticas demonstram que ocorreu redução dessa relação após os 90 dias de avaliação, comportamento que ocorre devido o maior acúmulo de MSA ao longo dos 120 dias de avaliação, sem ocorrer incremento de mesma proporção na MSR (Figura 4B).

A relação MSA/MSR é importante para se avaliar o crescimento adequado da parte aérea em relação ao sistema radicular, resultando em maior rusticidade e sobrevivência das plantas após o plantio (GOMES e PAIVA, 2004). Para essa relação o valor 2 foi definido por Birchler et al. (1998), sendo o almejado para o melhor crescimento da parte aérea e do sistema radicular. No presente trabalho a relação variou entre 2,23 e 3,78, valores semelhantes aos obtidos por Freitas et al. (2014) (2,33 a 3,04), quando avaliou o crescimento da mesma espécie em substratos a base de carvão vegetal durante 191 dias, sendo considerados adequados para o crescimento de mudas florestais.

O índice de qualidade de Dickson (IQD) das plantas de *D. odorata* não apresentou diferença estatística significativa em nenhum período de avaliação (Tabela 7). A regressão demonstra que ocorreu comportamento linear crescente em todos os substratos, evidenciando que as plantas exibiram contínuo acréscimo da qualidade até 120 dias (Figura 4C).

O IQD indica a qualidade das mudas com base na robustez e na distribuição da biomassa na planta (AGUIAR et al, 2011) e quanto maior for o valor obtido para esse índice, melhor será a qualidade da muda (BERNARDINO et al., 2005). Porém, Hunt (1990) estabelece IQD mínimo de 0,2 para que as mudas apresentem boas características de desenvolvimento. Neste estudo, no substrato SO3, a partir dos 30 dias as plantas já apresentava valor satisfatório de IQD, enquanto nos demais substratos somente aos 90 dias as plantas apresentaram valores de IQD > 0,2.

## 4 | CONCLUSÃO

O substrato orgânico composto por cascas de castanha-do-Brasil + esterco de equino + casca de café (1:1:1), possibilita a produção de mudas de *Dipteryx odorata* com qualidade satisfatória, podendo ser levadas à campo após 60 dias de crescimento em viveiro.

Todos os substratos orgânicos estudados foram adequados para a produção de mudas de *D. odorata* com qualidade suficiente para substituir o substrato comercial Vivatto Plus®.

## REFERÊNCIAS

ABAD, M.; NOGUERA, P. Los sustratos en los cultivos sin suelo. In: URRESTARAZU, M. (Ed).



**Manual de cultivo sin solo**, Universidad de Almería, España, 1997, p.101-147.

AGUIAR, F.F.A.; KANASHIRO, S.; TAVARES, A.R.; NASCIMENTO, T.D.R.; ROCCO, F.M. Crescimento de mudas de pau-brasil (*Caesalpinia echinata Lam.*), submetidas a cinco níveis de sombreamento. **Revista Ceres**, Viçosa, v.58, n.6, p.729-734, 2011.

ÁRAUJO, A.C.; DANTAS, M.K.L.; PEREIRA, W.E.; ALOUFA, M.A.I. Utilização de substratos orgânicos na produção de mudas de mamoeiro Formosa. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v.8, n.1, p.210-216, 2013.

ARTUR, A.G.; CRUZ, M.C.P.; FERREIRA, M.E.; BARRETTO, V.C. M.; YAGI, R.; Esterco bovino e calagem para formação de mudas de guanandi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.6, p.843-850, 2007.

BERNARDINO, D.C.S.; PAIVA, H.N.; NEVES, J.C.L.; GOMES, J.M.; MARQUES, V.B. Crescimento e qualidade de mudas de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan em resposta à saturação por bases do substrato. **Revista Árvore**, Viçosa, v.29, n.6, p.863-870, 2005.

BESSA, D.T.O.; MENDONÇA, M.S.; ARAÚJO, M.G.P. Morfo-anatomia de sementes de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Will. Fabaceae como contribuição ao estudo farmacológico de plantas da região Amazônica. **Acta Amazônica**, Manaus, v.31, n.3, p.357-364, 2001.

BIRCHLER, T.R.W.R.; ROYO, A.; PARDOS, M. La planta ideal: revision del concepto, parametros definitorios e implementacion practica. **Investigacion Agraria, Sistemas y Recursos Forestales**, Madrid, v.7, n.1/2, p.109-121, 1998.

CALDEIRA, M.V.W.; DELARMELINA, W.M.; FARIA, J.C. JUVANHOL, T.; SILVA, R. Substratos alternativos na produção de mudas de *Chamaecrista desvauxii*. **Revista Árvore**, Viçosa, v.37, n.1, p.31-39, 2013.

CALDEIRA, M.V.W.; SCHUMACHER, M.V.; BARICHELLO, L.R.; VOGEL, H.L.M.; OLIVEIRA, L.S. Crescimento de mudas de *Eucalyptus saligna* Smith. em função de diferentes doses de vermicomposto. **Floresta**, Curitiba, v.28, n.1-2, p.19-30, 2000.

CÂMARA, C.A.; ENDRES, L. Desenvolvimento de mudas de duas espécies arbóreas: *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. e *Sterculia foetida* L. sob diferentes níveis de sombreamento em viveiro. **Floresta**, Curitiba, v.38, n.1, p.43-51, 2008.

CARVALHO, P.E.R. **Cumaru-Ferro *Dipteryx odorata***. EMBRAPA, Comunicado Técnico 225, Colombo, 2009, p7.

DANIEL, O.; VITORINO, A.C.T.; ALOVISI, A.A.; MAZZOCHIN, L.; TOKURA, A. M.; PINHEIRO, E.R.P.; SOUZA, E.F. Aplicação de Fósforo em mudas de *Acacia mangium* Willd. **Revista Árvore**, Viçosa, v.21, n.2, p.163-168, 1997.

DELARMELINA, W.M.; CALDEIRA, M.V.W.; FARIA, J.C.T.; GONÇALVES, E. O.; ROCHA, R.L.F. Diferentes Substratos para a Produção de Mudas de *Sesbania virgata*. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v.21, n.2, p.224-233, 2014.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Centro Nacional de Pesquisa de Solos, Manual de Métodos de Análise de Solos**. 2.ed. Rio de Janeiro, Embrapa, 1997. 212p.

FERRAZ, M.V.; CENTURION, J.F.; BEUTLER, A.N. Caracterização física e química de alguns substratos comerciais. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.27, n.2, p.209-214, 2005.

FERREIRA, D.F. Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

- FREITAS, F.A.; KOPP, M.M.; SOUSA, R.O.; ZIMMER, P.D.; CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, A.C. Absorção de P, Mg, Ca e K e tolerância de genótipos de arroz submetidos a estresse por alumínio em sistemas hidropônicos. **Ciência Rural**, v.36, n.1, p.72-79, 2006.
- FREITAS, A.F.; SOUZA, L.A.G.; CARDOSO, I.M.; PAIVA, H.N. Fino de carvão vegetal em substrato para produção de mudas de *Dipteryx odorata*. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v.9, n.3, p.31-40, 2014.
- GOMES, J.M.; PAIVA, H.N. **Viveiros florestais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 2006. 116p.
- GOMES, J.M.; PAIVA, H.N. **Viveiros florestais: propagação sexuada**. 3.ed., Viçosa: UFV, 2004. 116p
- GOMES, J.M.; COUTO, L.; LEITE, H.G.; XAVIER, A.; GARCIA, S.L.R. Parâmetros morfológicos na avaliação da qualidade de mudas de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v.26, n.6, p.655-664, 2002.
- GONÇALVES, J.L.M.; POGGIANI, F. Substratos para produção de mudas florestais. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DO SOLO, 13. Águas de Lindóia, 1996. **Anais...** Piracicaba, Sociedade Latino Americana de Ciência do Solo, 1996. CD-Rom.
- HAYNES, R.J.; GOH, K.M. Evaluation of potting media for commercial nursery production of container-grown plants: IV – physical properties of a range amendment peat-based media. **Journal of Agricultural Research**, New Zealand, v.1, n.21, p.449-456, 1978.
- HERNANDEZ, W.; XAVIER, A.; PAIVA, H.N.; WENDLING, I. Propagação vegetativa do Jequitibá-rosa (*Cariniana estrellensis* (Raddi) KUNTZE) por estaquia. **Revista Árvore**, Viçosa, v.37, n.5, p.955-967, 2013.
- HUNT, G. A. Effect of styroblock design and copper treatment on morphology of conifer seedlings. In: PROCEEDINGS OF TARGET SEEDLING SYMPOSIUM, MEETING OF THE WESTERN FOREST NURSERY ASSOCIATIONS. 1990; Roseburg. **General Technical Report RM-200...** Roseburg: Fort Collins, USDA Forest Service, 1990, p.218-222.
- KNAPIK, J.G.; ANGELO, A.C.; Pó de basalto e esterco equino na produção de mudas de *Prunus sellowii* koehne (Rosaceae). **Floresta**, Curitiba, v.37, n.3, p.427-436, 2007.
- MALAVOLTA, E. ABC da Adubação. 4a edição. São Paulo SP, Editora Agronomia Ceres, 1979. 255 p.
- MARANHO, Á.S.; PAIVA, A.V.; PAULA, S.R.P. Crescimento inicial de espécies nativas com potencial madeireiro na Amazônia, Brasil. **Revista Árvore**, Viçosa, v.37, n.5, p.913-921, 2013.
- NISGOSKI, S.G.; MUÑIZ, I.B.; FRANÇA, R.F.; BATISTA, F.R.R. Anatomia do lenho carbonizado de *Copaifera cf. langsdorffii* Desf. e *Dipteryx odorata* (Aubl.) Will. **Ciência da Madeira**, Pelotas, v.3, n.2, p.66-79, 2012.
- PINTO, A.M.; MORELLATO, L.P.C.; BARBOSA, A.P. Fenologia reprodutiva de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd. (Fabaceae) em duas áreas de floresta na Amazônia Central. **Acta Amazônica**, Manaus, v.38, n.4, p.643-650, 2008.
- SILVA, I.R.; FERRUFINO, A.; SANZONOWICZ, C.; SMYTH, T. J.; ISRAEL, D.W.; CARTER JUNIOR, T.E. Interactions between magnesium, calcium and aluminum on soybean root elongation. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, n.5, p.747-754, 2005.
- SOUZA, C.R.; LIMA, R.M.B.; AZEVEDO, C.P.; ROSSI, L.M.B. Desempenho de espécies florestais para uso múltiplo na Amazônia. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v.36, n.77, p.7-14, 2008.

SOUZA, C.R.; AZEVEDO, C.P.; LIMA, R.M.; ROSSI, L.M.B. Comportamento de espécies florestais em plantios a pleno sol e em faixas de enriquecimento de capoeira na Amazônia. **Acta Amazônica**, Manaus, v.40, n.1, p.127-134, 2010.

TRAZZI, P.A.; CALDEIRA, M.V.W.; COLOMBI, R.; GONÇALVES, E.O. Qualidade de mudas de *Murraya paniculata* produzidas em diferentes substratos. **Floresta**, Curitiba, v.42, n.3, p.621-630, 2012.

VIEIRA, C.R.; WEBER, O.L.S.; SCARAMUZZA, J.F. Estudo de resíduos orgânicos para produção de mudas de paricá. **Revista de Ciências Ambientais**, Canoas, v.8, n.2, p.47-60, 2014.

## **SOBRE O ORGANIZADOR**

**JOSÉ MAX BARBOSA DE OLIVEIRA JUNIOR** é graduado em Ciências Biológicas (Licenciatura Plena) pela Faculdade Araguaia (FARA). Mestre em Ecologia e Conservação (Ecologia de Sistemas e Comunidades de Áreas Úmidas) pela Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT). Doutor em Zoologia (Conservação e Ecologia) pela Universidade Federal do Pará (UFPA) e Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG). É professor Adjunto I da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), lotado no Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas (ICTA). Orientador nos programas de Pós-Graduação *stricto sensu* em Sociedade, Ambiente e Qualidade de Vida (PPGSAQ-UFOPA); Sociedade, Natureza e Desenvolvimento (PPGSND-UFOPA); Biodiversidade (PPGBEES-UFOPA) e Ecologia (PPGECO-UFPA/EMBRAPA). Membro de corpo editorial dos periódicos Enciclopédia Biosfera e Vivências. Tem vasta experiência em ecologia e conservação de ecossistemas aquáticos continentais, integridade ambiental, ecologia geral, avaliação de impactos ambientais (ênfase em insetos aquáticos). Áreas de interesse: ecologia, conservação ambiental, agricultura, pecuária, desmatamento, avaliação de impacto ambiental, insetos aquáticos, bioindicadores, ecossistemas aquáticos continentais, padrões de distribuição.

Agência Brasileira do ISBN  
ISBN 978-85-7247-359-0

