

Benedito Rodrigues da Silva Neto
(Organizador)

Pesquisa Científica e Tecnológica em Microbiologia 2



Benedito Rodrigues da Silva Neto
(Organizador)

Pesquisa Científica e Tecnológica em Microbiologia 2



Atena
Editora

Ano 2020

2020 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do Texto © 2020 Os autores

Copyright da Edição © 2020 Atena Editora

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação: Karine de Lima

Edição de Arte: Lorena Prestes

Revisão: Os Autores



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição 4.0 Internacional (CC BY 4.0).

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

Profª Drª Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins

Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso

Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais

Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Carlos Antonio de Souza Moraes – Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa

Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa

Profª Drª Denise Rocha – Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia

Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Farias – Universidade Estácio de Sá

Prof. Dr. Eloi Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima

Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões

Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie di Maria Ausiliatrice

Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense

Profª Drª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso

Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins

Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Universidade Federal do Maranhão

Profª Drª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará

Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa

Profª Drª Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa

Profª Drª Sandra Regina Gardacho Pietrobon – Universidade Estadual do Centro-Oeste

Profª Drª Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia

Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador

Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará

Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Prof. Dr. William Cleber Domingues Silva – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano

Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás

Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná

Profª Drª Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia
Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Fágner Cavalcante Patrocínio dos Santos – Universidade Federal do Ceará
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Profª Drª Lina Raquel Santos Araújo – Universidade Estadual do Ceará
Prof. Dr. Pedro Manuel Villa – Universidade Federal de Viçosa
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Profª Drª Talita de Santos Matos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Tiago da Silva Teófilo – Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília
Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Profª Drª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federaci do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª 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. Alexandre Leite dos Santos Silva – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Carlos Eduardo Sanches de Andrade – Universidade Federal de Goiás
Profª Drª Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Marcelo Marques – Universidade Estadual de Maringá
Profª Drª Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba
Profª Drª 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. Msc. Adalberto Zorzo – Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza
Prof. Dr. Adailson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba
Prof. Msc. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão
Profª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico
Profª Msc. Bianca Camargo Martins – UniCesumar
Prof. Msc. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Msc. Cláudia de Araújo Marques – Faculdade de Música do Espírito Santo
Prof. Msc. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará
Profª Msc. Dayane de Melo Barros – Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Edwaldo Costa – Marinha do Brasil
Prof. Msc. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita
Prof. Msc. Gevair Campos – Instituto Mineiro de Agropecuária
Prof. Msc. Guilherme Renato Gomes – Universidade Norte do Paraná
Prof^a Msc. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia
Prof. Msc. José Messias Ribeiro Júnior – Instituto Federal de Educação Tecnológica de Pernambuco
Prof. Msc. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof^a Msc. Lilian Coelho de Freitas – Instituto Federal do Pará
Prof^a Msc. Liliani Aparecida Sereno Fontes de Medeiros – Consórcio CEDERJ
Prof^a Dr^a Lívia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás
Prof. Msc. Luis Henrique Almeida Castro – Universidade Federal da Grande Dourados
Prof. Msc. Luan Vinicius Bernardelli – Universidade Estadual de Maringá
Prof. Msc. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados
Prof^a Msc. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal
Prof^a Msc. Solange Aparecida de Souza Monteiro – Instituto Federal de São Paulo
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

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

P474 Pesquisa científica e tecnológica em microbiologia 2 [recurso eletrônico] / Organizador Benedito Rodrigues da Silva Neto. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2020.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-85-7247-939-4

DOI 10.22533/at.ed.394202201

1. Microbiologia – Pesquisa – Brasil. I. Silva Neto, Benedito Rodrigues da.

CDD 579

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná - Brasil
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

Temos o prazer de apresentar o segundo volume da obra “Pesquisa científica e tecnológica em microbiologia”, contendo trabalhos e pesquisas desenvolvidas em diversos locais do país que apresentam análises de processos biológicos embasados em células microbianas ou estudos científicos na fundamentação de atividades microbianas com capacidade de interferir nos processos de saúde/doença.

Conforme destacamos no primeiro volume, a microbiologia é um vasto campo que inclui o estudo dos seres vivos microscópicos nos seus mais variados aspectos como morfologia, estrutura, fisiologia, reprodução, genética, taxonomia, interação com outros organismos e com o ambiente além de aplicações biotecnológicas. Como uma ciência básica a microbiologia utiliza células microbianas para analisar os processos fundamentais da vida, e como ciência aplicada ela é praticamente a linha de frente de avanços importantes na medicina, agricultura e na indústria. Os microrganismos são encontrados em praticamente todos os lugares, e hoje possuímos ferramentas cada vez mais eficientes e acuradas que nos permitem investigar e inferir as possíveis enfermidades relacionadas aos agentes como bactérias, vírus, fungos e protozoários.

O potencial desta obra é enorme para futuras novas discussões, haja vista que enfrentamos a questão da resistência dos microrganismos à drogas, identificação de viroses emergentes, ou reemergentes, desenvolvimento de vacinas e principalmente a potencialização do desenvolvimento tecnológico no estudo e aplicações de microrganismos de interesse.

Portanto apresentamos aqui temas ligados à pesquisa e tecnologia microbiana são com a proposta de fundamentar o conhecimento de acadêmicos, mestres e todos aqueles que de alguma forma se interessam pela saúde em seus aspectos microbiológicos. Parabenizamos à todos os envolvidos que de alguma forma contribuíram em cada capítulo e cada discussão, com destaque principal à Atena Editora que tem valorizado a disseminação do conhecimento obtido nas pesquisas microbiológicas.

Assim desejo a todos uma ótima leitura!

Benedito Rodrigues da Silva Neto

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS ESPÉCIES <i>SYZYGIUM AROMATICUM</i> E <i>PUNICA GRANATUM</i>	
Ana Cristina Silva da Rocha Sandy Jacy da Silva Tatianny de Assis Freitas Souza	
DOI 10.22533/at.ed.3942022011	
CAPÍTULO 2	9
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA LECTINA DE FOLHAS DE <i>MUSSAENDA ALICIA</i> (RUBIACEAE)	
Isabella Coimbra Vila Nova Priscila Mirelly Pontes da Silva Welton Aaron de Almeida Talyta Naldeska da Silva João Ricardo Sá Leitão Camaroti Pollyanna Michelle da Silva Patrícia Maria Guedes Paiva Thiago Henrique Napoleão Emmanuel Viana Pontual	
DOI 10.22533/at.ed.3942022012	
CAPÍTULO 3	20
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MÉIS PRODUZIDOS EM SANTARÉM-PA, BRASIL	
Paulo Sérgio Taube Júnior Adelene Menezes Portela Bandeira Sorrel Godinho Barbosa de Souza Kárita Juliana Sousa Silva Igor Feijão Cardoso Júlio César Amaral Cardoso Márcia Mourão Ramos Azevedo Emerson Cristi de Barros José Augusto Amorim Silva do Sacramento Alberto Conceição Figueira da Silva Sílvia Katrine Rabelo da Silva	
DOI 10.22533/at.ed.3942022013	
CAPÍTULO 4	30
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA EM CEPAS DE LEVEDURAS ISOLADAS DE FRUTAS E BATATAS	
Rosimeire Oenning da Silva Karolay Amância de Jesus Nádia Maria de Souza Fabio Cristiano Angonesi Brod	
DOI 10.22533/at.ed.3942022014	

CAPÍTULO 5 39

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE UMA CERVEJA TIPO PILSEN COM ADIÇÃO DE CHÁ VERDE NA ETAPA DE MATURAÇÃO

Thaís Cardozo Almeida
Natália Pinto Guedes de Moraes
Tatiana da Silva Sant'Ana
Yorrana Lopes de Moura da Costa
Luana Tashima
Ligia Marcondes Rodrigues dos Santos

DOI 10.22533/at.ed.3942022015

CAPÍTULO 6 48

BOTULISMO NO BRASIL: PREVENÇÃO E CAUSA

Michele Reis Medeiros
Ana Luiza do Rosário Palma
Maria Juciara de Abreu Reis

DOI 10.22533/at.ed.3942022016

CAPÍTULO 7 65

CONTROLE BIOLÓGICO DE INSETOS-PRAGAS POR BACULOVÍRUS

Lyssa Martins de Souza
Shirlene Cristina Brito da Silva
Artur Vinícius Ferreira dos Santos
Débora Oliveira Gomes
Josiane Pacheco de Alfaia
Raiana Rocha Pereira
Raphael Coelho Pinho
Telma Fátima Vieira Batista

DOI 10.22533/at.ed.3942022017

CAPÍTULO 8 77

HIV/AIDS: O QUE EVOLUIU APÓS VINTE E CINCO ANOS?

Michael Gabriel Agostinho Barbosa
Severina Rodrigues de Oliveira Lins
Rhaldney Kaio Silva Galvão
Patrícia Alves Genuíno

DOI 10.22533/at.ed.3942022018

CAPÍTULO 9 85

LACTOBACILLUS FERMENTUM: POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO PARA APLICAÇÕES NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA E ALIMENTÍCIA

Brenda Ferreira de Oliveira
Amanda Caroline de Souza Sales
Daniele de Aguiar Moreira
Mari Silma Maia da Silva
Gabrielle Damasceno Evangelista Costa
Gustavo Henrique Rodrigues Vale de Macedo
Lívia Muritiba Pereira de Lima Coimbra
Rita de Cássia Mendonça de Miranda
Adrielle Zagmignan
Luís Cláudio Nascimento da Silva

DOI 10.22533/at.ed.3942022019

CAPÍTULO 10 98

LACTOBACILLUS RHAMNOSUS E O DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS BIOATIVOS

Amanda Caroline de Souza Sales
Brenda Ferreira de Oliveira
Deivid Martins Santos
Mari Silma Maia da Silva
Gabrielle Damasceno Evangelista Costa
Gustavo Henrique Rodrigues Vale de Macedo
Lívia Muritiba Pereira de Lima Coimbra
Rita de Cássia Mendonça de Miranda
Adrielle Zagnignan
Luís Cláudio Nascimento da Silva

DOI 10.22533/at.ed.39420220110

CAPÍTULO 11 108

MULTIPLEX PCR FOR THE DETECTION OF DIARRHEAGENIC *ESCHERICHIA COLI* PATHOTYPES IN CHILDREN WITH ACUTE DIARRHEA

Daniela Cristiane da Cruz Rocha
Anderson Nonato do Rosario Marinho
Karina Lúcia Silva da Silva
Edvaldo Carlos Brito Loureiro
Eveline Bezerra Sousa

DOI 10.22533/at.ed.39420220111

CAPÍTULO 12 120

PADRONIZAÇÃO DO CULTIVO DO *ASPERGILLUS SP.* M2.3 PARA PRODUÇÃO DE AMILASE E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA ENZIMA

Izabela Nascimento Silva
Tarcisio Michael Ferreira Soares de Oliveira
Alice Gomes Miranda
Barbhara Mota Marinho
Vivian Machado Benassi

DOI 10.22533/at.ed.39420220112

CAPÍTULO 13 133

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA PARA CONSUMO EM ESCOLAS DO KM 13.5, 14 E 16, MINGA GUAZÚ, PARAGUAI (2017-2018)

Eva Fabiana Mereles Aranda
María Belén Chilavert González
María Andrea Guillen Encina
Omar Ariel Burgos Paster
Rossana Haydee Cañete Lentini
Sady María González Fariña
Asuka Shimakura Tsuchida
Gregor Antonio Cristaldo Montiel
Catherin Yissel Ríos Navarro
Andrea Giménez Ayala
Gabriela Sosa Benegas

DOI 10.22533/at.ed.39420220113

CAPÍTULO 14	143
STURDINESS OF BAKER'S YEAST STRAINS TO NATURAL BIOACTIVE COMPOUNDS	
Patrícia Regina Kitaka Glyn Mara Figueira Marta Cristina Teixeira Duarte Cláudia Steckelberg Camila Delarmelina Valéria Maia de Oliveira Maria da Graça S. Andrietta	
DOI 10.22533/at.ed.39420220114	
CAPÍTULO 15	154
TRENDS IN THE SCIENTIFIC PRODUCTION ABOUT PARACOCCIDIODES BRASILIENSIS AND ITS MAIN TECHNIQUES OF STUDY	
Amanda Fernandes Costa Flávia Melo Rodrigues Felipe de Araújo Nascimento Benedito R. Da Silva Neto	
DOI 10.22533/at.ed.39420220115	
CAPÍTULO 16	166
UMA ABORDAGEM SOBRE PRODUÇÃO DE XILANASES PELO FUNGO <i>THERMOMYCES LANUGINOSUS</i> UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO INDUTOR	
Andreza Gambelli Lucas Costa Nascimento Carla Lieko Della Torre Marina Kimiko Kadowaki	
DOI 10.22533/at.ed.39420220116	
SOBRE O ORGANIZADOR	177
ÍNDICE REMISSIVO	178

ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS ESPÉCIES *Syzygium aromaticum* E *Punica granatum*

Data de submissão: 13/11/19

Data de aceite: 10/12/2019

Ana Cristina Silva da Rocha

Centro Universitário UniFavip WYDEN

Caruaru, Pernambuco

Link para Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6077859885720039>

Sandy Jacy da Silva

Centro Universitário UniFavip WYDEN

Caruaru, Pernambuco

Link para Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0354485242834305>

Tatianny de Assis Freitas Souza

Centro Universitário UniFavip WYDEN

Caruaru, Pernambuco

Link para Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/8829756785242359>

RESUMO: Espécies vegetais como *Syzygium aromaticum* (cravo-da-Índia) e *Punica granatum* (romã) começaram a chamar atenção de grandes empresas de renome internacional, as quais investiram cientificamente para desenvolver produtos a partir de suas matérias-primas. Com isto, o objetivo desse estudo consistiu em analisar a atividade antibacteriana das espécies vegetais *Syzygium aromaticum* (cravo-da-Índia) e *Punica granatum* (romã) contra cepas

de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Para tal, produziu-se um extrato etanólicos das cascas dos frutos de romã e um óleo essencial das sementes de cravo-da-Índia. Realizou-se os testes antibacterianos inserindo poços e discos nas placas de petri contendo Ágar Mueller-hinton com o extrato e óleo analisados na concentração de 60µL para os poços e 20µL para os discos e comparando suas atividades. Como controle positivo utilizou-se discos de amoxicilina na concentração de 10µg e como controle negativo utilizou-se soro fisiológico. Neste estudo foi encontrado que a amoxicilina exerceu considerável inibição bacteriana com halos de 22mm para *Staphylococcus aureus* e 20mm para *Escherichia coli*, já o controle negativo não exerceu inibição. O cravo possuiu atividade antibacteriana levemente menor que a do controle positivo para ambos os microrganismos testados. Já o extrato da romã obteve atividade superior ao controle positivo contra a espécie *Staphylococcus aureus*, atividade levemente menor que o controle para a espécie *Escherichia coli* na técnica utilizando os discos e atividade igual à da amoxicilina na técnica de poços. Levando em consideração tais achados, conclui-se que as espécies romã e cravo-da-Índia apresentem expressiva atividade antibacteriana contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

PALAVRAS-CHAVE: *Syzygium aromaticum*,

ANALYSIS OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *Syzygium aromaticum* AND *Punica granatum* SPECIES

ABSTRACT: Plant species such as *Syzygium aromaticum* (clove) and *Punica granatum* (pomegranate) have begun to draw the attention of large internationally renowned companies, which have invested scientifically to develop products from their raw materials. Thus, the aim of this study was to analyze the antibacterial activity of the plant species *Syzygium aromaticum* (clove) and *Punica granatum* (pomegranate) against strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. For this purpose, an ethanolic extract of the pomegranate peel and an essential oil of the clove seeds were produced. Antibacterial tests were performed by inserting wells and discs in the petri dishes containing Mueller-hinton Agar with the extract and oil analyzed at a concentration of 60µL for the wells and 20µL for the discs and comparing their activities. A positive control consisted of amoxicillin disks at a concentration of 10µg and a negative control used saline. In this study it was found that amoxicillin exerted considerable bacterial inhibition with 22mm halos for *Staphylococcus aureus* and 20mm for *Escherichia coli*, whereas the negative control did not inhibit. The carnation had slightly lower antibacterial activity than the positive control for both microorganisms tested. The pomegranate extract had higher activity than the positive control against the species *Staphylococcus aureus*, slightly lower than the control for the species *Escherichia coli* in the technique using the disks and activity equal to that of amoxicillin in the well technique. Considering these findings, it is concluded that the pomegranate and clove species have significant antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains.

KEYWORDS: *Syzygium aromaticum*, *Punica granatum*, Microbiology.

INTRODUÇÃO

A utilização de espécies vegetais objetivando recuperar ou manter a saúde tem sido frequentemente atrelada ao desenvolvimento do ser humano (ROCHA et al., 2015). Tal prática referia-se, principalmente, a alimentação, promoção e recuperação da saúde (SILVA, 2016), onde a população agrupava informações e experiências sobre o ambiente que a envolvia por meio de seus descendentes favorecendo assim, sua sobrevivência (VARELA; AZEVEDO, 2014).

Espécies vegetais começaram a chamar atenção de grandes empresas de renome internacional, as quais investiram cientificamente para desenvolver produtos a partir de suas matérias-primas (NÓBREGA et al., 2017). A atividade dessas plantas passa por uma intensa investigação científica, e é dita como uma importante fonte para novos produtos biologicamente ativos (ELLER et al., 2015). Ainda que tenha constituído a base da terapêutica medicamentosa até o surgimento da síntese química, a fitoterapia continua em lugar de destaque na sociedade. Firmando-se simultaneamente como parte da cultura de um povo (STEFANELLO et al., 2018).

A multirresistência microbiana tem sido definida como um dos principais e

mais preocupantes problemas de saúde pública da atualidade (JESUS; TORELI, 2019). A busca por terapias alternativas que reduzam ou substituam os tratamentos convencionais de antibioticoterapia é de grande interesse na área clínica (LOUREIRO et al., 2016). Dentre as espécies vegetais que apresentam comprovada atividade antimicrobiana, encontra-se o cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum* L.). As atividades bioativas desta espécie contra microrganismos devem-se, principalmente, a presença de um composto denominado de eugenol, que atua como bactericida (ADEFEGHA et al., 2016).

O cravo-da-Índia apresenta forte ação contra algumas bactérias de importância clínica como as espécies *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (SILVA et al., 2015). Outra espécie medicinal que possui consideráveis atividades biológicas contra os microrganismos é a romã (*Punica granatum* L.). Na composição desta espécie encontram-se alcaloides, fenóis, ácido elágico, ácido gálico e alguns taninos como a punicalina, punicalgina, galagildilactona e corilagina, com ação antibiótica (AL-HUQAIL et al., 2018). Estudos revelaram que extratos desta espécie possuem inibição significativa contra o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Streptococcus mutans* e *Escherichia coli* (ROSAS-BURGOS et al., 2017; UMAR et al., 2016). Tendo em vista as importantes atividades antimicrobianas do cravo-da-Índia e da romã, este estudo objetivou analisar a atividade antibacteriana destas espécies contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

MÉTODOS

Produção do extrato e óleo essencial das espécies vegetais

As cascas dos frutos de romã (lote 0080, pertencentes a Cia da Saúde) foram secas em estufa botânica durante 5 dias na temperatura de 40°C, posteriormente foram trituradas e maceradas na proporção de 100g de material vegetal para 400mL de etanol absoluto em um vidro âmbar durante um período de 7 dias. Após este processo, ocorreu a filtração deste extrato fluido. Este, teve sua solução etanólica extraída em evaporador rotativo em aproximadamente 90%, completando a secagem em estufa botânica na temperatura de 40°C.

A extração do cravo-da-Índia ocorreu por Sohlet, utilizando 20g das sementes trituradas (lote 0075, pertencentes a Cia da Saúde) e 170mL de clorofórmio em um balão de fundo redondo sob manta aquecedora na temperatura de 40°C. O processo de extração ocorreu durante 4 horas, em que, o solvente possuía contato com a amostra e depois era coletado. Após este período ocorreu então a recuperação do solvente e a parte oleosa recuperada foi utilizada.

Determinação da atividade antibacteriana

Para determinar a atividade antimicrobiana das espécies vegetais, foram

utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os microrganismos foram suspensos em soro fisiológico na escala 0,5 de MacFarland, posteriormente foram semeados por tapetamento nas placas de petri contendo ágar Mueller-Hinton. Para a determinação da atividade antibacteriana foram utilizadas 2 técnicas de difusão dos compostos vegetais.

A primeira técnica consistiu na utilização de discos de papel filtro com 20µL do extrato de romã e óleo de cravo-da-Índia. Já a segunda técnica de difusão dos compostos foi realizada mediante a inserção de poços de 5mm de diâmetro com pipetagem direta de 60µL dos produtos vegetais. Como controle positivo utilizou-se discos antibióticos de amoxicilina de 10µg e como controle negativo utilizou-se soro fisiológico. Todo o procedimento foi realizado em triplicata, após a exposição dos microrganismos ao extrato e óleo essencial, ocorreu a incubação das placas em estufa bacteriológica a 35°C por um período de 24 horas. Após a incubação, o diâmetro de cada halo de inibição formado foi medido em milímetros com o auxílio de uma régua.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O aumento de infecções microbianas e a resistência dos patógenos a medicamentos disponíveis no mercado tem despertado grande interesse na pesquisa por novas drogas de origem vegetal (JENSEN et al, 2015). Pesquisadores apontam a necessidade de desenvolvimento de pesquisas mais detalhadas para a descoberta de novas substâncias antimicrobianas (BESRA M e KUMAR V, 2018). Em relação a sensibilidade das cepas utilizadas neste estudo, esta foi avaliada contra amoxicilina (controle positivo) e soro fisiológico (controle negativo), demonstrando uma considerável sensibilidade das cepas bacterianas, expressas na Tabela 1.

Microrganismos	Amoxicilina				Soro fisiológico	
<i>Staphylococcus aureus</i>	22	21	22	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	20	20	21	0	0	0

Tabela 1: Perfil de sensibilidade das cepas utilizadas.

Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Além disso, os resultados fotográficos também foram documentados a fim de comparar com os indicados na literatura científica, conforme expresso nas figuras 1 e 2.



Figura 1: Resultado com os discos e poços do óleo essencial de cravo contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

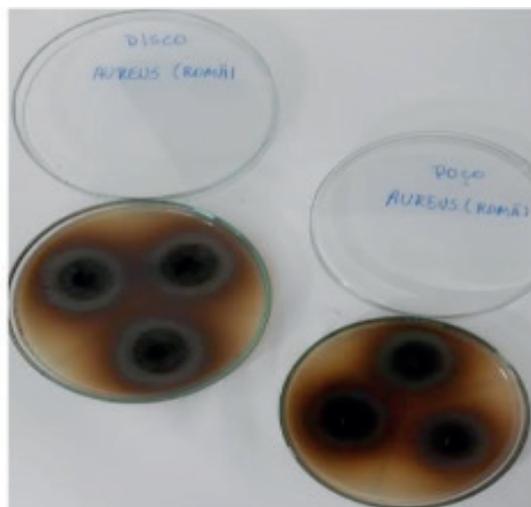


Figura 2: Resultado com os discos e poços do extrato de romã contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

O cravo-da-Índia expressou atividade antibacteriana levemente menor que a do controle positivo com amoxicilina, tanto para *S. aureus*, quanto para *E. coli*. Já o extrato da romã apresentou atividade antibacteriana superior ao controle positivo para a espécie *S. aureus*, atividade levemente menor contra *E. coli* na técnica utilizando os discos e atividade igual a amoxicilina na técnica de poços, conforme indicado na Tabela 2. Em relação a atividade antibacteriana da romã, pesquisadores citam que os compostos punicalgina e ácido elágico são os principais responsáveis por esta atividade na espécie, a atividade bioativa desses compostos é capaz de romper a membrana bacteriana (UMAR et al., 2016). Em concordância com os resultados desta pesquisa, autores citam que o extrato etanólico das cascas dos frutos de romã é capaz de inibir o crescimento da espécie *Staphylococcus aureus* (MOREIRA et al., 2014). A literatura relata também que tal extrato é eficaz contra *Staphylococcus aureus*,

Escherichia coli, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis*, como demonstrado neste estudo (PAGLIARULO et al., 2016; ROSAS-BURGOS et al., 2017).

Microrganismos	Cravo-da-Índia							
	Discos (20 μ L)				Poços (60 μ L)			
	Halos de inibição			Média	Halos de inibição			Média
<i>Staphylococcus aureus</i>	15	15	16	15,33	16	15	15	15,33
<i>Escherichia coli</i>	14	13	15	14	14	14	14	14
	Romã							
	Discos (20 μ L)				Poços (60 μ L)			
	Halos de inibição			Média	Halos de inibição			Média
<i>Staphylococcus aureus</i>	22	22	23	22,33	19	19	18	18,66
<i>Escherichia coli</i>	18	17	18	17,66	20	20	21	20,33

Tabela 2: Atividade antibacteriana do extrato e óleo essencial analisados.

Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Em relação a atividade antimicrobiana do cravo-da-Índia, pesquisadores citam que o eugenol presente na espécie possui amplo espectro bacteriano, com ação na membrana celular microbiana (GUPTA et al., 2013). Foi comprovado também que o terpineol presente no cravo-da-Índia possui atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*, como já demonstrado nesse estudo. Pesquisadores citaram que este composto é capaz de diminuir o tamanho da célula bacteriana, rompendo a parede e membrana celular, ocasionando também diminuição do núcleo e citoplasma (LIU et al., 2015). Em concordância com os resultados deste estudo, pesquisadores encontraram que o óleo essencial de cravo é eficaz contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* e *Pseudomonas aeruginosa* (FU et al., 2017). A atividade antibacteriana do cravo também foi comprovada por outros pesquisadores, inibindo o crescimento da espécie *Escherichia coli* na concentração de 6,25 μ L/mL, da espécie *Staphylococcus aureus* na concentração de 3,12 μ L/mL e da espécie *Listeria monocytogenes* na concentração de 1,5 μ L/mL (ATARÉS; CHIRALT, 2016).

CONCLUSÃO

O extrato etanólico das cascas dos frutos de romã e o óleo essencial das sementes de cravo-da-Índia possuem atividade antibacteriana expressiva contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, tanto para a técnica em discos quanto para a técnica de poços. Cabe salientar que o extrato da romã possuiu atividade antibacteriana levemente menor contra estas cepas testadas na técnica de discos. É notável a utilização destas espécies medicinais e de fitoterápicos como uma alternativa

no combate a infecções microbianas, sendo um tratamento de origem natural, com baixo custo e redução dos efeitos adversos oriundos da terapêutica atual.

REFERÊNCIAS

ADEFEGHA, S. A.; OBOH, G.; OYELEYE, S. I.; OSUNMO, K. Alteration of starch hydrolyzing enzyme inhibitory properties, antioxidant activities, and phenolic profile of clove buds (*Syzygium aromaticum* L.) by cooking duration. **Food science & nutrition**, v. 4, n. 2, p. 250-260, 2016.

AL-HUQAIL, A. A.; ELGAALY, G. A.; IBRAHIM, M. M. Identification of bioactive phytochemical from two *Punica* species using GC-MS and estimation of antioxidant activity of seed extracts. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 7, p. 1420-1428, 2018.

ATARÉS, L.; CHIRALT, A. Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. **Trends in food science & technology**, v. 48, p. 51-62, 2016.

BESRA, M.; KUMAR, V. In vitro investigation of antimicrobial activities of ethnomedicinal plants against dental caries pathogens. **3 Biotech**, v. 8, n. 5, p. 257, 2018.

BORDIGNON, J. C. Etiologia de infecções hospitalares e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em um hospital do sudoeste do Paraná, Brasil. **RBAC**, v. 49, n. 3, p. 283-8, 2017.

ELLER, S. C. W. S.; FEITOSA, V. A.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P. CATÃO, R. M. R. Avaliação antimicrobiana de extratos vegetais e possível interação farmacológica in vitro. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 1, 2015.

FU, Y.; ZU, Y.; CHEN, L.; SHI, X.; WANG, Z.; SUN, S.; EFFERTH, T. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. **Phytotherapy research**, v. 21, n. 10, p. 989-994, 2017.

GUPTA, A.; DUHAN, J.; TEWARI, S.; SANGWAN, P.; YADAV, A.; SINGH, G.; SAINI, H. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of *Syzygium aromaticum*, *Ocimum sanctum* and *Cinnamomum zeylanicum* plant extracts against *Enterococcus faecalis*: a preliminary study. **International endodontic journal**, v. 46, n. 8, p. 775-783, 2013.

JENSEN, R. H.; ASTVAD, K. M. T.; SILVA, L. V.; SANGLARD, D.; JØRGENSEN, R.; NIELSEN, K. F.; ARENDRUP, M. C. Stepwise emergence of azole, echinocandin and amphotericin B multidrug resistance in vivo in *Candida albicans* orchestrated by multiple genetic alterations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 9, p. 2551-2555, 2015.

JESUS, G.; TORELI, J. D. Efeitos Antimicrobianos dos Extratos de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry Aplicados à Saúde, Indústria e Agricultura. **Atas de Saúde Ambiental-ASA**, v. 7, n. 1, p. 113, 2019.

LIU, Q.; NIU, H.; ZHANG, W.; MU, H.; SUN, C.; DUAN, J. Synergy among thymol, eugenol, berberine, cinnamaldehyde and streptomycin against planktonic and biofilm-associated food-borne pathogens. **Letters in applied microbiology**, v. 60, n. 5, p. 421-430, 2015.

LOUREIRO, R. J.; ROQUE, F.; RODRIGUES, A. T.; HERDEIRO, M. T.; RAMALHEIRA, E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de saúde pública**, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016.

MOREIRA, G.; MATSUMOTO, L. S.; SILVA, R. M.; DOMINGUES, P. F.; MELLO-PEIXOTO, E. C. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* Linn. sobre *Staphylococcus* spp. isolados de leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, p. 626-632, 2014.

NÓBREGA, J. S.; SILVA, F. A.; BARROSO, R. F.; CRISPIM, D. L.; OLIVEIRA, C. J. A. Avaliação do conhecimento etnobotânico e popular sobre o uso de plantas medicinais junto a alunos de graduação. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental**. v. 11, n.1, p.07 - 13, jan-dez, 2017.

PAGLIARULO, C.; DE-VITO, V.; PICARIELLO, G.; COLICCHIO, R.; PASTORE, G.; SALVATORE, P.; VOLPE, M. G. Inhibitory effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenol extracts on the bacterial growth and survival of clinical isolates of pathogenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Food chemistry**, v. 190, p. 824-831, 2016.

ROCHA, F. D., ARAÚJO, M. D., COSTA, N. D. L., SILVA, R. D. O uso terapêutico da flora na história mundial. **Holos**, v. 1, 2015.

ROSAS-BURGOS, E. C.; BURGOS-HERNÁNDEZ, A.; NOGUERA-ARTIAGA, L.; KAČÁNIOVÁ, M.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, F.; CÁRDENAS-LÓPEZ, J. L.; CARBONELL-BARRACHINA, Á. A. Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts as affected by cultivar. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 3, p. 802-810, 2017.

SILVA N. C. S. TUDO QUE É NATURAL NÃO FAZ MAL? INVESTIGAÇÃO SOBRE O USO DE PLANTAS MEDICINAIS E MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS POR IDOSOS, NA CIDADE DE IAPULESTE DE MINAS GERAIS. **ÚNICA Cadernos Acadêmicos**, v. 2, n. 1, 2016.

SILVA, A. A.; ANJOS, M. M.; RUIZ, S. P.; PANICE, L. B.; MIKCHA, J. M. G.; JUNIOR, M. M.; ABREU-FILHO, B. A. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Thimus vulgaris* (TOMILHO), *Syzygium aromaticum* (CRAVO-DA-INDIA) E *Rosmarinus officinalis* (ALECRIM) E DOS CONSERVANTES BENZOATO DE SÓDIO E SORBATO DE POTÁSSIO EM *Escherichia coli* E *Staphylococcus aureus*. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 33, n. 1, 2015.

STEFANELLO, S.; KOZERA, C.; RUPPELT, B. M.; FUMAGALLI, D.; CAMARGO, M. P.; SPONCHIADO, D. Levantamento do uso de plantas medicinais na universidade federal do Paraná, Palotina-PR, Brasil. **Extensão em Foco**, v. 1, n. 15, p. 1- 13 2018.

UMAR, D.; DILSHAD, B.; FARHAN, M.; ALI, A.; BAROUDI, K. The effect of pomegranate mouthrinse on *Streptococcus mutans* count and salivary pH: An in vivo study. **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**, v. 7, n. 1, p. 13, 2016.

VARELA, D. S. S., AZEVEDO, D. M. D. Opinião de médicos e enfermeiros sobre o uso da fitoterapia e plantas medicinais na Atenção Básica. **Rev. APS**, v. 17, n. 2, 2014.

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA LECTINA DE FOLHAS DE *Mussaenda alicia* (RUBIACEAE)

Data de aceite: 10/12/2019

Isabella Coimbra Vila Nova

Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Biociências, Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica e Fisiologia,
Recife – Pernambuco
<http://lattes.cnpq.br/8445185379848462>

Priscila Mirelly Pontes da Silva

Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Biociências, Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica e Fisiologia,
Recife – Pernambuco
<http://lattes.cnpq.br/2934215705805382>

Welton Aaron de Almeida

Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal,
Programa de Pós-Graduação em Biociência
animal,
Recife – Pernambuco
<http://lattes.cnpq.br/6880632191779221>

Talyta Naldeska da Silva

Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal,
Programa de Pós-Graduação em Biociência
animal,
Recife – Pernambuco
<http://lattes.cnpq.br/8762925956752737>

João Ricardo Sá Leitão Camaroti

Universidade Federal de Pernambuco,

Centro de Biociências, Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica e Fisiologia,
Recife – Pernambuco
<http://lattes.cnpq.br/0075414377323480>

Pollyanna Michelle da Silva

Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Biociências, Departamento de
Bioquímica,
Recife – Pernambuco
<http://lattes.cnpq.br/0563176148137978>

Patrícia Maria Guedes Paiva

Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Biociências, Departamento de
Bioquímica,
Recife – Pernambuco
<http://lattes.cnpq.br/2885145995086459>

Thiago Henrique Napoleão

Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Biociências, Departamento de
Bioquímica,
Recife – Pernambuco
<http://lattes.cnpq.br/0869167120016962>

Emmanuel Viana Pontual

Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal,
Recife – Pernambuco
<http://lattes.cnpq.br/1777060469196142>

RESUMO: *Mussaenda alicia* (mussaenda rosa) é uma planta ornamental e seu potencial

na medicina tem sido relatado. Este trabalho descreve a purificação de uma lectina (proteína ligadora de carboidratos) de folhas de *Mussaenda alicia* e a investigação de sua atividade contra microrganismos de importância médica. O extrato salino de folhas de *M. alicia* aglutinou eritrócitos de coelho, indicando a presença de lectinas e foi utilizado como material de partida para purificação dessa atividade utilizando cromatografia em coluna de quitina. Um único pico de proteínas adsorvidas (PQ) foi recuperado e também apresentou elevada atividade de lectina. O extrato não apresentou atividade antimicrobiana. Por outro lado, PQ foi agente bacteriostático (CMI: 0,05 mg/mL) para *Escherichia coli* e fungistático (CMI: 0,025 mg/mL) e fungicida (CMF:0,1 mg/mL) para *Candida albicans*. Em conclusão, apesar da ausência de atividade antimicrobiana do extrato de folhas de *M. alicia*, a lectina isolada a partir dele representa um novo agente antimicrobiano contra bactéria e fungo de interesse médico.

PALAVRAS-CHAVE: Antimicrobiano natural, *Candida albicans*; *Escherichia coli*; Lectina.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *Mussaenda alicia* (RUBIACEAE) LEAF LECTIN

ABSTRACT: *Mussaenda alicia* (*mussaenda rosa*) is an ornamental plant and its potential in medicine has been reported. This work describes the purification of a lectin (carbohydrate binding protein) from leaves of *Mussaenda alicia* and the investigation of its activity against microorganisms of medical importance. The saline extract of *M. alicia* leaves agglutinated rabbit erythrocytes, indicating the presence of lectins and was used as starting material for purification of this activity using a chitin column chromatography. A single peak of adsorbed proteins (PQ) was recovered and also exhibited high lectin activity. The extract did not present antimicrobial activity. On the other hand, PQ was bacteriostatic agent (IMC: 0.05 mg / mL) for *Escherichia coli* and fungistatic (IMC: 0.025 mg / mL) and fungicide (CMF: 0.1 mg / mL) for *Candida albicans*. In conclusion, despite the absence of antimicrobial activity of *M. alicia* leaf extract, the lectin isolated from it represents a new antimicrobial agent against bacterium and fungus of medical interest.

KEYWORDS: Natural antimicrobial, *Candida albicans*; *Escherichia coli*; Lectin.

1 | INTRODUÇÃO

As bactérias são microrganismos procariontes que podem ser encontrados em vários habitats incluindo o solo, corpos d'água, os vegetais e, inclusive o corpo humano, onde integram uma microbiota complexa, como a encontrada no revestimento do sistema digestório (CHEN et al.,2019; LANDRY et al., 2018; KHAN e SAJJAD, 2018). Algumas bactérias são capazes de causar doenças quando entram em um organismo; sua patogenicidade pode estar relacionada com a secreção de toxinas liberadas quando as bactérias se desintegram ou com a indução de sensibilidade a suas propriedades antigênicas(PAIXÃO e DOS SANTOS CASTRO, 2016).

As espécies bacterianas são diferenciadas pela morfologia, composição

química, necessidades nutricionais, atividades bioquímicas e pela fonte de energia (TORTORA et al. 2012). A parede celular das bactérias é constituída principalmente por peptidoglicano, o que lhes dá forma, confere força e rigidez (MADIGAN et al., 2010; TORTORA et al. 2012; DIAS-JÁCOME et al., 2016).

Escherichia coli é um bacilo gram-negativo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, que habita o trato intestinal de animais homeotérmicos, entre eles o homem (GOMES et al., 2016). É uma bactéria comensal, geralmente não patogênica, que faz parte da microbiota intestinal e apresenta um papel importante no funcionamento do organismo (SOUZA et al, 2016). Apesar disso, existem subgrupos de *E. coli* que expressam fatores de virulência, como adesinas fimbriais ou afimbriais, que os tornam agentes causadores de algumas doenças do trato intestinal e extraintestinal (KAPER et al, 2004; MANGES, 2016). A Organização Mundial da Saúde (2017) publicou um catálogo de 12 famílias de bactérias que representam forte ameaça para a saúde humana. Nessa lista de “agentes patogênicos prioritários” *E. coli* figura no grupo crítico das bactérias multirresistentes.

A indústria farmacêutica dispõe de uma grande variedade de antibióticos, porém, a resistência das bactérias a esses fármacos se desenvolve como uma natural consequência da habilidade que a população bacteriana tem de se adaptar a esses compostos. Essa resistência bacteriana ocorre quando as bactérias mudam em resposta ao uso desses medicamentos, aumentando a pressão seletiva e, dessa forma o número de linhagens de microrganismos também aumenta (WHO, 2018). Segundo Saez et al. (2010) as bactérias têm desenvolvido pelo menos um mecanismo de resistência para cada uma das classes de antibióticos disponíveis até o momento.

Fungos são seres eucarióticos e heterotróficos que possuem parede celular composta por quitina e glicanos (STEVENS et al., 2006). Eles apresentam um forte potencial patogênico para os humanos, podendo causar micoses superficiais ou as mais severas (GUPTA et al., 2019). Em países tropicais, as infecções mais comuns em humanos são relacionadas à pele e mucosas, se destacando aquelas causadas pelas espécies do gênero *Candida* (PORTILLO et al., 2001; RAO, 2019).

A candidíase é uma das infecções fúngicas que mais acomete os pacientes em unidades hospitalares. O agente etiológico mais frequente é a espécie *Candida albicans*, porém outras espécies como *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei*, podem frequentemente colonizar e/ou infectar os tecidos orais (CALDERONE, et al 2012; RAO, 2019; BAC et al., 2019).

Candida albicans está entre os patógenos fúngicos mais importantes do gênero *Candida*, sendo considerada a espécie mais comum nas infecções humanas (LIU et al., 2017). Essas infecções variam de infecções cutâneas e mucosas superficiais, como candidíase, leveduras vaginais e assaduras, a infecções sistêmicas, com taxas de mortalidade consideráveis. (NOBILE; JOHNSON, 2015). A transição morfogênica de uma célula de levedura típica para um organismo de crescimento micelial hifal é um dos fatores que contribuem para a patogenicidade desta espécie (CASSONE, 2014).

Apesar do aumento do número de antimicóticos disponíveis comercialmente nos últimos anos, estes ainda estão em menor quantidade frente aos antibióticos. Além disso, é difícil o tratamento das infecções causadas por fungos devido ao aumento da resistência aos medicamentos atuais (SHARIFZADEH, 2016). Nesse sentido, as plantas têm sido investigadas como fontes promissoras de antimicrobianos.

A família Rubiaceae compreende cerca de 130 gêneros e 1.500 espécies distribuídas de maneira cosmopolita, sendo mais encontradas em áreas tropicais. No Nordeste brasileiro são encontradas em torno de 309 espécies, distribuídas em 66 gêneros (DE MELO NASCIMENTO, 2018).

O gênero *Mussaenda* é composto por plantas floríferas, sendo identificadas 190 espécies nativas de regiões tropicais e subtropicais da África e Ásia. Essas espécies são mais utilizadas como plantas ornamentais devido ao fato de suas vistosas e coloridas brácteas serem semelhantes a sépalas brancas, margeadas (brancas com margens róseas), rosas ou vermelhas com flores amarelas, além de sua fragrância agradável (BACHER, 2016).

Esse gênero tem sido investigado quanto às atividades farmacológicas, sendo relatada a presença de metabólitos secundários como iridoides, triterpenos e flavonóides em seus tecidos. O potencial de plantas do gênero *Mussaenda* na medicina é também reconhecido e inclui atividades citotóxica, anti-inflamatória, antiviral, antioxidante e antibacteriana (VIDYALAKSHMI, 2008), diurética, antipirética e eficácia em laringofaringites, gastroenterite e disenteria aguda, além de atividade anti-fertilidade (VENKATESH, et al 2013).



Figura 1. *Mussaenda alicia*. (Fonte: Vila-Nova, 2016)

A espécie *Mussaenda alicia* (figura 1), é conhecida popularmente como mussaenda-rosa, mussaenda rosa- arbustiva e tem sido explorada para fins ornamentais, contudo, do ponto de vista biotecnológico, essa espécie é pouco estudada e, ao nosso conhecimento e até a presente data, não há relatos na literatura

internacional de estudos sobre o potencial antimicrobiano. Este trabalho teve como objetivo determinar a atividade da lectina de folhas de *Mussaenda alicia* contra microrganismos de importância médica.

2 | METODOLOGIA

2.1 Obtenção do extrato das folhas de *M. alicia* e isolamento de lectinas

Todos os procedimentos descritos neste trabalho foram registrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) com o número de cadastro A828C24. Folhas de *M. alicia* (10 g) foram coletadas no Jardim Didático do Centro de Ciências Biológicas da UFPE e postas para secar por 7 dias a temperatura ambiente. O extrato foi obtido a partir da homogeneização (16 h a 28°C) da farinha de folhas secas de *M. alicia*, na proporção de 2% (p/v), em solução salina (NaCl 0,15 M), utilizando agitador magnético. O extrato foi posteriormente filtrado em gaze e papel de filtro e centrifugados (9.000 g; 15 min, 4 C). Em seguida, para isolamento da atividade de lectina, o extrato foi submetido à cromatografia em coluna de quitina equilibrada a um fluxo de 20 mL/h com NaCl 0,15 M. Após a aplicação do extrato a coluna foi lavada com a solução de equilíbrio até que a absorbância (280 nm) fosse desprezível. Em seguida, as proteínas adsorvidas (lectina) foram eluídas da coluna com ácido acético 1 M. As frações eluídas foram dialisadas contra água destilada (2 h) seguida de NaCl 0,15 M (6 h) para complete remoção do eluente.

2.2 Determinação da concentração de proteínas e atividade hemaglutinante

A quantificação protéica foi realizada de acordo com Lowry *et al.* (1951), utilizando-se curva padrão (31,25 a 500 µg/mL) de albumina sérica bovina. A presença de lectinas no extrato e na preparação ao longo do processo de purificação foi avaliada através de ensaio de atividade hemaglutinante em placas de microtitulação. Solução de NaCl 0,15 M foi adicionada a todos os poços da placa e, em seguida, alíquota de 50 µL da amostra foi adicionada ao segundo poço e serialmente diluída até o final da segunda fileira. Foram então adicionados 50 µL de suspensão (2,5% v/v) de eritrócitos tratados com glutaraldeído (BING *et al.*, 1967). A atividade hemaglutinante (AH) foi obtida como o inverso da maior diluição da amostra que promoveu total hemaglutinação. Atividade hemaglutinante específica (AHE) foi definida pela razão entre a AH e a concentração de proteínas (mg/mL). A metodologia para coleta dos eritrócitos foi aprovada pelo Comitê de Ética de Uso e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (processo 23076.033782/2015-70).

2.3 Avaliação da especificidade de ligação a carboidratos

A determinação da especificidade de ligação a carboidratos foi realizada através de ensaio de inibição da atividade hemaglutinante. Para tanto, o extrato em NaCl 0,15 M e a melhor preparação lectínica (P_Q) após a cromatografia foi previamente incubada com monossacarídeos (0,2 M), dissacarídeos (0,2 M) ou glicoproteínas (0,5 M) por 15 min a 28°C antes da determinação da atividade hemaglutinante como descrito anteriormente.

2.4 Avaliação da atividade antimicrobiana

O extrato de folhas e PQ foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e *Candida albicans* pelo método de microdiluição em placa. Foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços onde foram adicionados a cada poço 100 μ L de meio de cultura, com cada fileira correspondendo a uma replicata do ensaio utilizando um dos microorganismos. Em cada fileira, o extrato ou PQ (100 μ L) foi adicionado ao terceiro poço e então submetida a dez diluições sucessivas (até 1:1024). Ao segundo poço, foi adicionado 100 μ L de NaCl 0,15 M, efetuada homogeneização e 100 μ L foram descartados. Em seguida, a todos os poços de cada fileira (exceto o primeiro) foram adicionados 20 μ L da suspensão de microrganismo. O primeiro poço de cada fileira correspondeu ao controle de esterilidade do meio (para eliminar a possibilidade de contaminação) e o segundo poço correspondeu ao controle 100% de crescimento (ausência da amostra). A densidade ótica a 490 nm (DO_{490}) foi determinada em espectrofotômetro para microplacas no tempo 0 e após 24 h de incubação a 37°C. Cada ensaio foi realizado em duplicata. A concentração mínima inibitória (CMI) foi definida como a menor concentração da amostra que promoveu redução maior ou igual a 50% em relação ao controle

Havendo inibição do crescimento (CMI), a concentração mínima bactericida (CMB) foi determinada. Alíquotas do poço controle 100% e de cada poço onde houve inibição do crescimento foram transferidas para placas de petri contendo meio de cultura sólido. As placas foram incubadas por 24 h a 37°C. A menor concentração capaz de reduzir o número de UFCs em 99,9% em relação ao inóculo inicial correspondeu à concentração mínima bactericida (CMB) ou fungicida (CMF).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Muitos metabólitos vegetais, inclusive proteínas, estão sendo investigados quanto ao efeito sobre microrganismos. As lectinas são proteínas que fazem ligações com carboidratos de maneira reversível e específica e, devido ao envolvimento dos carboidratos em diversos processos celulares e fisiológicos, podem exercer

uma série de atividades biológicas. Como exemplos disso podem ser citadas as atividades inseticida, antimicrobiana, anti-inflamatória, antitumoral, antioxidante e de reconhecimento de carboidratos ou glicoconjugados presentes na superfície celular de diferentes organismos (ASKARI *et al.*, 2012; JIMENEZ *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2019). Esses relatos estimularam a pesquisa de lectinas nas folhas de *M. alicia*.

O extrato de folhas de *M. alicia* apresentou atividade hemaglutinante de 32 e a cromatografia em coluna de quitina revelou apenas um pico (PQ) de proteínas adsorvidas após eluição com ácido acético 1 M (Figura 2). PQ apresentou atividade hemaglutinante específica de 16.384, correspondendo a um fator de purificação de 170 vezes em relação ao extrato.

O ensaio de inibição com os açúcares revelou que a atividade hemaglutinante do extrato de folhas foi inibida por frutose, fucose, lactose, glicose, N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina e ribose. Já a atividade de PQ foi inibida pelo monossacarídeo glicose e pelas glicoproteínas ovoalbina e fetuína, indicando que PQ corresponde à lectina glicose-específica e ligadora de quitina de folhas de *M. alicia*.

O extrato de folhas não foi capaz de interferir no crescimento e sobrevivência dos microrganismos. Por outro lado, a lectina (PQ) inibiu o crescimento de colônias de *E. coli* (CMI: 0,05 mg/mL) e de *C. albicans* (CMI: 0,025 mg/mL). PQ não causou mortalidade em *E. coli*, mas foi fungicida para *C. albicans* contudo causou mortalidade apenas desta última (CMF = 0,1 mg/mL).

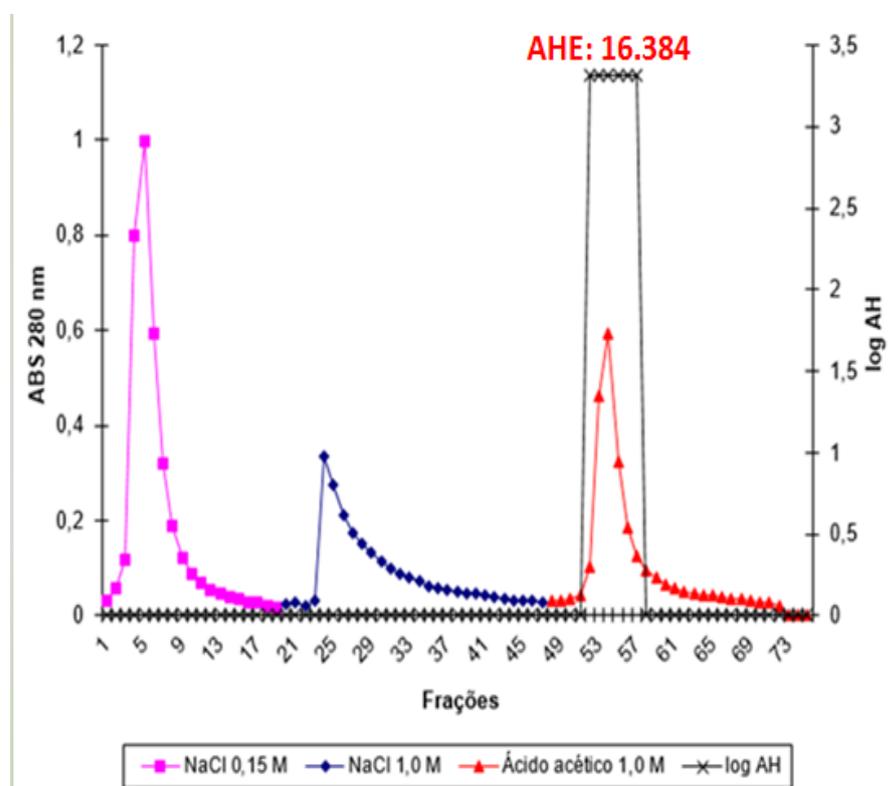


Figura 2. Cromatografia de afinidade em coluna de quitina do extrato de folhas de *Mussaenda alicia* obtido em NaCl 0,15. As frações 52-57 corresponderam a PQ.

O mecanismo da ação antibacteriana de lectinas pode estar relacionado à sua

capacidade de interação com componentes da parede celular das bactérias, tais como ácidos teicóicos e teicurônicos, peptidoglicanos e lipopolissacarídeos (PAIVA et al., 2010). As lectinas também podem ocasionar a formação de poros na parede celular da bactéria e induzir o extravasamento de proteínas intracelulares (COELHO, 2018).

Silva et al. (2019) reportaram a atividade antibacteriana de uma lectina da sarcotesta da fruta *Punica granatum* (PgTeL) contra cinco isolados de *E. coli* resistentes a drogas capazes de produzir β -lactamases, com valores de CMI e CMB variando de 12,5 a 50,0 $\mu\text{g} / \text{mL}$ e de 25,0 a 100,0 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectivamente.

Também tem sido relatada a ação antifúngica das lectinas através da interação com carboidratos presentes nas paredes celulares dos fungos, causando a inibição do crescimento ou até mesmo a ruptura da parede celular (SILVA et al, 2018). As lectinas também possuem atividades antifúngicas que estão relacionadas à interação com carboidratos presentes na parede celular como a quitina, α -manana e β -glucana, podendo causar a inibição do crescimento, alterações na parede celular, diminuição na absorção dos nutrientes e dificuldades para a germinação de esporos (DA SILVA, 2019).

A lectina de *Calliandra surinamensis* (CasuL) foi ativa contra *Candida krusei* com o CMI e CMF de 125 e 250 g/mL , respectivamente (PROCOPIO et al., 2017). Utilizando o Calcofluor White (Fluorocromo), o qual se liga à quitina presente na parede celular da levedura, os autores revelaram que CasuL foi capaz de danificar a integridade das células de *C. krusei* por causar desintegração da sua parede celular.

4 | CONCLUSÃO

O extrato de folhas de *M. alicia* é fonte de lectina, mas não representa um agente antimicrobiano. Apesar disso, a lectina isolada representa um novo biomaterial ativo contra bactéria e fungo de interesse médico. Este resultado pode ser devido à interação com outros compostos presentes no extrato que sejam capazes de inibir o efeito antimicrobiano da lectina. Outros estudos são necessários para indicar o mecanismo da ação antimicrobiana da lectina sobre *E. coli* e *C. albicans*.

5 | AGRADECIMENTOS

Os autores expressam sua gratidão ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento à pesquisa (408789/2016-6). Isabella C. Vila Nova agradece ao CNPq pela bolsa de estudos de pós-graduação (Mestrado). Welton A. de Almeida agradece a Capes pela bolsa de estudos de pós-graduação (Doutorado). Talyta N. da Silva agradece à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa de Iniciação Científica (BIC-1919-2.09/19). Pollyanna M. da Silva agradece à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa de Fixação de Pesquisador (BFP).

REFERÊNCIAS

- A. SHARIFZADEH, A.R. KHOSRAVI, S. AHMADIAN, Chemical composition and antifungal activity of *Satureja hortensis* L. essential oil against planktonic and biofilm growth of *Candida albicans* isolates from buccal lesions of HIV+ individuals, **Microbial Pathogenesis**, 96 (2016) 1-9.
- ASKARI, G.A. et al. Evaluation of Antimicrobial Activity of Aqueous and Ethanolic Extracts of Leaves of *Vitis vinifera* Collected from Different Regions in Morocco. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**. v.12, n.1, p.85-90, 2012.
- BAC, Nguyen Duy, et al. Prevalence of *Candida* bloodstream isolates from patients in two hospitals in Vietnam. **Iranian journal of microbiology**, 2019, 11.2: 108.
- BACHER L. Plantas incríveis. Dierberger plantas LTDA. 2016. 10
- BING, D.H.; WEYAND J. G.; STAVINSKY A. B. Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 124, p. 1166-1170, 1967.
- CALDERONE RA, CLANCY CJ. *Candida* and Candidiasis: ASM Press, Washington, DC, 2012.
- CASSONE, A. **Vulvo vaginal *Candida albicans* infections: pathogenesis, immunity and vaccine prospects**. **Bjog: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, [s.l.], v. 122, n. 6, p.785-794, 23 jul. 2014.
- CHEN, Lin et al. Enrichment of soil rare bacteria in root by an invasive plant *Ageratina adenophora*. **Science of The Total Environment**, v. 683, p. 202-209, 2019
- COELHO, L. C. B. B. et al. Lectins as antimicrobial agents. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, n. 5, p. 1238–1252, nov. 2018
- DA SILVA, José Dayvid Ferreira et al. *Portulaca elatior* root contains a trehalose-binding lectin with antibacterial and antifungal activities. **International journal of biological macromolecules**, v. 126, p. 291-297, 2019.
- DA SILVA, P. M.; DE MOURA, M. C. ; GOMES, F. S. ; DA SILVA TRENTIN, D. ; SILVA DE OLIVEIRA, A. P. ; DE MELLO, G. S. V. ; DA ROCHA PITTA, M. G. ; DE MELO REGO, MOACYR JESUS BARRETO ; COELHO, LUANA CASSANDRA BREITENBACH BARROSO ; MACEDO, A. J. ; DE FIGUEIREDO, R. C. B. Q. ; PAIVA, P. M. G. ; NAPOLEÃO, T. H . PgTel, the lectin found in *Punica granatum* juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. **International journal of biological macromolecules**, v. 108, p. 391-400, 2018
- DE MELO NASCIMENTO, Janilde; OLIVEIRA, Jadson Vinicius Nascimento. Caracterização Morfológica de *Mussaenda erythrophylla* e *Mussaenda alicia* (Rubiaceae) no paisagismo de Caxias, Maranhão. **Revista Ciência & Saberes-Facema**, v. 4, n. 1, p. 794-797, 2018.
- DIAS-JÁCOME, Emanuel et al. Gastric microbiota and carcinogenesis: the role of non-*Helicobacter pylori* bacteria: a systematic review. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**, v. 108, n. 9, p. 530-540, 2016.
- GOMES, T. A. T. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 3–30, dez. 2016.
- GUNASEKARAN S, SUNDARAMOORTHY S, SATHIAVELU M, ARUNACHALAM S. **The genus *Mussaenda*: A phytopharmacological review**. **J Chem Pharm Res**. 2015; 7: 1037-42.
- GUPTA, Krishan Lal, et al. Opportunistic infections occurring in renal transplant recipients in tropical

countries. **Indian Journal of Transplantation**, 2019, 13.2: 110.

JIMENEZ, P. et al. Effects of short-term heating on total polyphenols, antocyanins, antioxidant activity and lectins of different parts of dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.). **Plant Foods for Human Nutrition**. v. 69. p. 168-174, 2014.

KAPER JB, NATARO JP, MOBLEY HL. **Pathogenic Escherichia coli**. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2:123-40

KHAN, Imran; SAJJAD, Wasim. Morphological, biochemical and molecular characterization of culturable epilithic and endolithic bacteria from rocks of Ayubia (Murree), lower Himalaya, Pakistan. 2018.

K.VENKATESH; U.UPENDRA RAO; G.V.N.KIRANMAYI; R.NARASIMHA NAIK; N.S.V.MUKHARJEE; V.N.V VINAY; K.Phanindra. *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research*, 2013, 4(1), 8-10. K.S.Vidyalakshmi; HANNAH R.VASANTHI; G.V.RAJAMANICKAM. **Ethnobotanical Leaflets**, 2008, 12, 469-475

LANDRY, Zachary Cole et al. Optofluidic single-cell genome amplification of sub-micron bacteria in the ocean subsurface. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1152, 2018.

LOWRY, O.H *et al.* (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 193, pp. 265–275.

LIU, X. et al. Antifungal Compounds against *Candida* Infections from Traditional Chinese Medicine. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–12, 2017.

MADIGAN MT, MARTINKO JM, DUNLAP PV, CLARK DP (2010) *Microbiologia de Brock*. 12 ed. Tradução: Maranhão AQ, Lima BD, Kyaw CM. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160p. ISBN 978-85-363-2093-9

MANGES, A. R. *Escherichia coli* and urinary tract infections: the role of poultry-meat. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 2, p. 122–129, fev. 2016.

NAPOLEÃO, T. H; GOMES, F.S.; LIMA T.A; SANTOS, N. D. L; SÁ, R. A; ALBUQUERQUE, A. C.; COELHO, L. C. B. B; PAIVA, P. M. G. Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 52-59, 2011.

NOBILE, Clarissa J.; JOHNSON, Alexander D.. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. **Annual Review Of Microbiology**, [s.l.], v. 69, n. 1, p.71-92, 15 out. 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. **WHO: Geneva, Switzerland**, 2018.

PAIVA, P.M.G.; GOMES, F.S.; NAPOLEÃO, T.H.; SÁ, R.A.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. In: VILAS, A.M. (Org.) *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology: Current Research*, **Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**. Badajoz, Formatex Research Center, pp. 396-406, 2010.

PAIXÃO, L. A., & DOS SANTOS CASTRO, F. F. (2016). Colonização da microbiota intestinal e sua influência na saúde do hospedeiro. *Universitas: Ciências da Saúde*, 14(1), 85–96.

PORTILLO, A. et al. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.76, p.93-8,2001.

P.M. SILVA, M.C. MOURA, F.S. GOMES, D.S. TRENTIN, A.P.S. OLIVEIRA, G.S.V. MELLO, M.G.R. PITTA, M.J.B.M. REGO, L.C.B.B. COELHO, A.J. MACEDO, R.C.B.Q. FIGUEIREDO, P.M.G. PAIVA, T.H. NAPOLEÃO, PgTeL, the lectin found in Punica granatum juice, is an antifungal agent against Candida albicans and Candida krusei, **International Journal of Biological Macromolecules**.108 (2018) 391-400.

PROCÓPIO, Thamara Figueiredo et al. CasuL: A new lectin isolated from Calliandra surinamensis leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **International journal of biological macromolecules**, v. 98, p. 419-429, 2017.

RAO, Rajeshwari Prabhakar. KEYWORDS Antibacterial Therapy, Nonpregnant, Vulvovaginal Candidiasis. Study of vulvovaginal candidiasis among nonpregnant women attending a tertiary care teaching hospital in Karnataka, india, 2019, 98313.

ROSARIO, T. L. The ornamental mussaendas of the Philippines. Laguna: **Institute of Plant Breeding**, 1984.

S. RATANAPO, W. NGAMJUNYAPORN, M. CHULAVATNATOL, Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, P. syringae pv mori, **Plant Science**.160 (2001) 739-744

STEVENS, D.A.; ICHINOMIYA, M.; KOSHI, Y.; HORIUUCHI, H. Escape of *Candida* from caspofungin inhibition at concentrations above the MIC (paradoxical effect) accomplished by increased cell wall chitin; evidence for β -1,6-glucan synthesis inhibition by caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 9, p. 3160–3161, 2006.

SILVA, M.R.O. Detecção de atividade antifúngica de extratos de plantas do manguezal de Vila Velha, Itamaracá- PE. 2004. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco.

SILVA, J. D. F. ; SILVA, S. P. ; SILVA, P. M. ; VIEIRA, A. M. ; ARAÚJO, L. C. C. ; LIMA, T. A. ; OLIVEIRA, A. P. S. ; CARVALHO, L. V. N. ; PITTA, M. G. R. ; REGO, M. J. B. M. ; PINHEIRO, I. O. ; ZINGALI, R. B. ; CAVALCANTI, M. S. M. ; NAPOLEÃO, T. H. ; PAIVA, P. M. G. . Portulaca elatior root contains a trehalose-binding lectin with antibacterial and antifungal activities. **International journal of biological macromolecules**, v. 126, p. 291-297, 2019.

SOUZA, Cintya de Oliveira et al. Escherichia coli enteropatogênica: uma categoria diarreio gênica versátil. **Revista Pan-amazônica de Saúde**, [s.l.], v. 2, n. 7, p.1-2, jul. 2016.

TORTORA GJ, FUNKE BR, CASE CL (2012) Microbiologia. 10 ed. Tradução: Silva AM, Quinan BR, Rosa CA... [et al.]. Porto Alegre: **Artmed**, 2012. 934p. ISBN 978-85-363-2606-1

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. **WHO website**.

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MÉIS PRODUZIDOS EM SANTARÉM-PA, BRASIL

Data de aceite: 10/12/2019

Paulo Sérgio Taube Júnior

Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Biodiversidade e Florestas; Santarém – Pará

Adelene Menezes Portela Bandeira

Universidade Federal do Oeste do Pará, Programa de Pós Graduação em Biociências; Santarém – Pará

Sorrel Godinho Barbosa de Souza

Universidade Federal do Oeste do Pará, Programa de Pós Graduação em Biociências; Santarém – Pará

Kárita Juliana Sousa Silva

Universidade Federal do Oeste do Pará, Programa de Pós Graduação em Biociências; Santarém – Pará

Igor Feijão Cardoso

Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Biodiversidade e Florestas; Santarém – Pará

Júlio César Amaral Cardoso

Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Biodiversidade e Florestas; Santarém – Pará

Márcia Mourão Ramos Azevedo

Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Biodiversidade e Florestas; Santarém – Pará

Emerson Cristi de Barros

Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Biodiversidade e Florestas; Santarém – Pará

José Augusto Amorim Silva do Sacramento

Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Biodiversidade e Florestas; Santarém – Pará

Alberto Conceição Figueira da Silva

Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Biodiversidade e Florestas; Santarém – Pará

Sílvia Katrine Rabelo da Silva

Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Saúde Coletiva; Santarém – Pará

RESUMO: O mel é um produto natural que além de ser uma excelente fonte de energia, pode apresentar propriedades benéficas a saúde, tais como anti-inflamatório, antioxidante e antimicrobiano. Considerando essas propriedades, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do mel de Apis melífera, produzido em oito comunidades, em dois períodos distintos (seco e chuvoso), em Santarém-PA, Brasil, contra microrganismos de interesse clínico: Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Escherichia coli e Candida albican., utilizando método de difusão em poços. Todas as amostras de mel, em ambos os períodos de produção, apresentam atividade bacteriostática frente a S. aureus e S. epidermidis, no entanto, nenhuma amostra apresentou capacidade de inibir o crescimento de microrganismos gram-negativos (E. coli e C. albicans). As amostras do período seco apresentaram menores valores de CMI (12,5%, v/v), contra os Gram-positivos que no período chuvoso (25,0-100%, v/v).

PALAVRAS-CHAVE: Agentes antibacterianos, *Apis mellifera*, apiterapia, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF HONEY PRODUCED IN SANTARÉM-PA, BRAZIL

ABSTRACT: Honey is a natural product that besides being an excellent source of energy, can have health beneficial properties such as anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial. Considering these properties, this study aimed to evaluate the antimicrobial activity of *Apis mellifera* honey, produced in eight communities, in two distinct periods (dry and rainy), in Santarém-PA, Brazil, against microorganisms of clinical interest: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*, using well diffusion method. All honey samples, in both production periods, showed bacteriostatic activity against *S. aureus* and *S. epidermidis*, however, no samples showed capacity to inhibit the growth of gram-negative microorganisms (*E. coli* and *C. albicans*). The samples from the dry period presented lower MIC values (12.5%, v/v) against Gram-positive than in the rainy season (25.0-100%, v/v).

KEYWORDS: Anti-bacterial agents, *Apis mellifera*, apitherapy, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*.

1 | INTRODUÇÃO

O mel é um alimento saudável o qual apresenta em sua composição carboidratos (principalmente glicose e frutose), água, compostos aromáticos (e.g. derivados do benzeno, cetonas, terpenos), proteínas, enzimas, compostos fenólicos, ácidos orgânicos, vitaminas, flavonoides, aminoácidos e minerais (BORSATO et al., 2014; RAHMAN et al., 2017). Vale destacar que a composição do mel depende de diversos fatores, entre eles: à sua origem floral, fatores geográficos, sazonalidade, subespécies de abelhas e tratamento pós-coleta (ESCUREDO et al., 2013; DA SILVA et al., 2016). Essa composição confere ao mel muitas propriedades benéficas à saúde, dentre as quais se destacam: atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, anticancerígena e bactericida (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010).

Sua composição complexa e variável lhe proporciona atividade antimicrobiana sobre um amplo espectro de microrganismos, tanto de patógenos sensíveis quanto antibiótico-resistentes (OVERGAAUW; KIRPENSTEIJN, 2006). A atividade antimicrobiana do mel, principalmente, contra microrganismos resistentes como *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* está relacionada ao seu baixo teor de água e alto teor de açúcares, baixo pH e presença de diversos compostos provenientes de metabólitos secundários de vegetais (e.g. compostos fenólicos e flavonoides) (HALAWNI; SHOHAYEB, 2011).

Sendo assim, um desequilíbrio que ocorra nestes fatores poderá acarretar a ausência, deficiência ou alteração nas atividades biológicas do mel. Neste sentido, o presente trabalho objetiva avaliar a atividade antimicrobiana de méis de abelha

Apis mellifera, coletados em dois períodos distintos em Santarém-PA, Brasil, contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

Descrição das amostras

Foram coletadas amostras de mel de abelha *Apis mellifera*, por meio de extração manual sem uso de fumigação ou qualquer produto químico, em 08 comunidades do município de Santarém-PA, Brasil: Cipoal (M1) (02°54'13'S e 54°78'37'O), Cedro (M2), (02°64'15'S e 54°77'89'O), Bueira (M3) (02°63'77'S e 54°65'13'O), Boa Fé NA (M4) (02°61'35'S e 54°65'92'O), Boa Fé AP (M5) (02°61'89'S e 54°66'47'O), Tipizal (M6) (02°62'73'S e 54°61'13'O), Jacamim (M7) (02°59'34'S e 54°62'21'O) e Terra Amarela (M8) (02°58'42'S e 54°65'95'O). As amostras foram obtidas em dois períodos distintos, no mês de novembro de 2014 (MS; período seco) e junho de 2015 (MC; período chuvoso) em triplicada para cada ponto de coleta, totalizando 48 amostras. As amostras foram armazenadas em tubos Falcon® a temperatura ambiente para posteriores análises.

Avaliação antimicrobiana

Os microrganismos teste utilizados nos ensaios antimicrobianos foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Cândida albicans* (AC 01) (CEFAR®, São Paulo, Brazil). As cepas foram mantidas em meio Nutriente estéril (NM – 3,0 g de peptona bacteriológica, 5,0 g de extrato de carne, 5,0 g NaCl em 1000 mL de solução aquosa, pH inicial 7,2 - 7,4 até a preparação das suspensões utilizadas nos ensaios.

Para a realização dos testes de atividade antimicrobiana *in vitro* foi utilizado o método de difusão em poço. Uma alíquota de 100 µL de cada suspensão dos microrganismos foi ajustada a 0,5 da Escala de McFarland, correspondendo a 10⁸ UFC mL⁻¹ de bactéria e semeada em placas de Petri estéreis contendo Ágar Müeller-Hinton (MHA - Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) com o auxílio de swab estéril. Foram confeccionados orifícios de 6 mm de diâmetro no meio de cultura MHA com o auxílio de um molde formando os poços. Posteriormente cada orifício foi preenchido com 100 µL de mel *in natura*. O material foi incubado a 35°C por 24 h (THAKUR et al., 2009). Para o ensaio com a *C. albicans*, utilizou-se o meio *Sabouroud dextrose* (SDA). O controle negativo foi feito em poços com solução de *glicose diluída em água deionizada à 65% (w/v)*. *Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os halos de inibição do crescimento microbiano foram medidos em milímetros. Para fins de comparação foi realizado um antibiograma de cada microrganismo utilizando discos de medicamentos convencionais contra bactérias (ampicilina, amoxicilina + clavulanato,*

amicacina, cefepime, ceftazidima, cefalotina, cefuroxima, cloranfenicol, clindamicina, ciprofloxacino, cefoxitina, gentamicina, moxifloxacina, meropenem, nitrofurantoina, norfloxacina, oxacillina, penicillina G, rifampicina, sulfazotrim, tetraciclina and vancomicina - Cefar®, São Paulo, Brazil). As placas foram incubadas à 35 °C por 48 horas até a leitura dos halos de inibição, com o auxílio de uma régua, sendo possível determinar através dos halos inibitórios, se o microrganismo em análise é sensível, intermediário ou resistente ao antimicrobiano testado.

Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

A Concentração Inibitória Mínima é um método quantitativo onde se observa a reação entre a concentração padronizada de um inóculo e o menor valor de concentração da substância em teste necessária para impedir o crescimento do microrganismo (CLSI, 2013). Para este teste foram utilizadas placas de poliestireno com 96 poços, utilizando-se da técnica de microdiluição em caldo (TAVEIRA et al., 2010). As amostras não diluídas foram adicionadas no primeiro poço, seguindo-se uma diluição seriada com água deionizada nos demais poços para se obter o mel em diferentes concentrações: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56 e 0,78% (v/v), ficando a solução com volume final de 100 μ L. Posteriormente, para a determinação do CMI, foram adicionados aos poços 100 μ L de caldo Mueller Hinton Broth (MHB - Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) e uma alíquota de 10 μ L de cada suspensão bacteriana correspondendo a 10⁸ UFC/mL de bactéria (BLAIR et al., 2009). Como corante químico foi utilizado 15 μ L de solução resazurina (0,01%). O controle negativo foi realizado com caldo MHB e o controle positivo com 100 μ L do antibiótico Ampicilina (100 μ g/mL). O controle osmótico foi feito com a substituição das amostras de mel por solução de glicose e água deionizada em diferentes concentrações: 65,00, 32,50, 16,25, 8,12, 4,06, 2,03, 1,02 e 0,51% (w/v). Todas as placas foram incubadas à 35 °C por 24 horas. A CMI foi considerada como a menor concentração das amostras de mel capaz de inibir o crescimento bacteriano.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

Todas as amostras apresentaram atividade inibitória satisfatória contra pelo menos um microrganismo testado, sendo que estes mostraram diferentes respostas no ensaio, variando de sensível (*S. aureus* e *S. epidermidis*) à totalmente resistentes (*E. coli* e *C. albicans*) (Tabela 1).

	Amostras	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Cândida albicans</i>	<i>Escherichia coli</i>
Período Seco	MS1	13,0 ± 0,0ab	16,5 ± 0,7bcd	Nd	Nd
	MS2	15,0 ± 1,4ab	17,0 ± 0,0abcd	Nd	Nd
	MS3	13,5 ± 2,1ab	15,5 ± 0,7cd	Nd	Nd
	MS4	13,0 ± 0,0ab	18,5 ± 0,7abc	Nd	Nd
	MS5	12,5 ± 0,7ab	17,0 ± 1,4abcd	Nd	Nd
	MS6	14,0 ± 0,0ab	15,5 ± 0,7cd	Nd	Nd
	MS7	14,5 ± 0,7ab	17,0 ± 0,0abcd	Nd	Nd
	MS8	12,5 ± 0,7ab	17,0 ± 1,4abcd	Nd	Nd
Período Chuvoso	MC1	15,5 ± 0,7a	20,0 ± 1,4a	Nd	Nd
	MC2	12,0 ± 1,4ab	16,0 ± 1,4bcd	Nd	Nd
	MC3	13,0 ± 0,0ab	19,0±0,0ab	Nd	Nd
	MC4	12,0 ± 1,4ab	15,5 ± 0,7cd	Nd	Nd
	MC5	11,5 ± 0,7b	15,0 ± 0,0d	Nd	Nd
	MC6	11,5 ± 0,7b	16,5 ± 0,7bcd	Nd	Nd
	MC7	11,5 ± 0,7b	15,0 ± 0,0d	Nd	Nd
	MC8	12,0 ± 0,0ab	16,5 ± 0,7bcd	Nd	Nd

Tabela 1. Atividade antimicrobiana do mel de abelha com formação de halos de inibição contra microrganismos teste (mm).

Todas as amostras de mel, em ambos os períodos de produção, apresentam atividade bacteriostática frente a *S. aureus* e *S. epidermidis*, no entanto, nenhuma amostra apresentou capacidade de inibir o crescimento de microrganismos gram-negativos (*E. coli* e *C. albicans*). Neste estudo, a intensidade da atividade antimicrobiana variou, apresentando zonas de inibição entre 11,5 mm e 20,0 mm. A Figura 1 mostra os halos formados pelas amostras contra o microrganismo *S. epidermidis*.

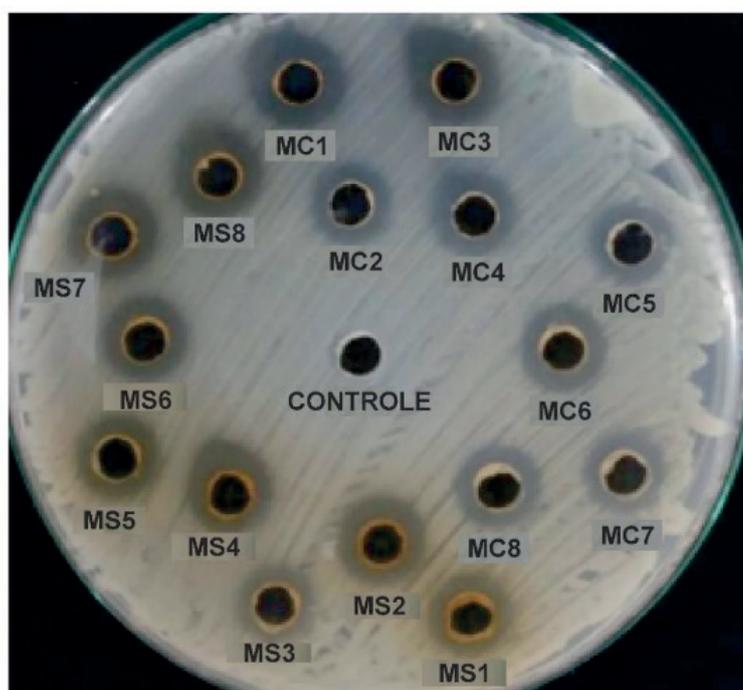


Figura 1. Halos de inibição formados pelas amostras contra o microrganismo *S. epidermidis*.

Peralta (2010) verificou em seu estudo que aproximadamente 90% das amostras de mel testadas apresentaram atividade frente a *S. aureus*, 30% frente a *E. coli* e nenhuma apresentou atividade contra *C. albicans*. Lusby; Coombes; Wilkinson (2005) avaliaram méis da Oceania frente a 13 microrganismos, no entanto, nenhuma amostra apresentou atividade contra *C. albicans*. Da Cruz et al. (2014) avaliaram a atividade antimicrobiana de amostras de méis de abelhas sem ferrão (*Melipona compressipes*, *Melipona seminigra*) e com ferrão *Apis mellifera* coletadas no estado no Amazonas, Brasil contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Chromobacterium violaceum* e *Candida albicans*. Todas as amostras testadas apresentaram atividade antimicrobiana sobre todos os patógenos testados, sendo a menor inibição observada para *Candida albicans*.

Os microrganismos Gram-positivos são mais sensíveis à ação do mel que os Gram-negativos, principalmente as leveduras como a *C. albicans* (possui uma membrana externa de lipopolissacarídeos de baixa permeabilidade (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005; SLAMA, 2008; ESCUREDO et al., 2013).

Para fins de comparação, foi realizado o antibiograma dos microrganismos teste usando medicamentos sintéticos convencionais. A sensibilidade é mostrada na Tabela 2.

Antimicrobiano	Quant. por disco (µg)	Microrganismos		
		<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>
Ácido Nalidíxico	30	R	R	R
Ampicilina	10	R	R	S
Amicacina	30	S	S	S
Cefepime	30	S	S	R
Ceftazidina	30	R	R	R
Cefalotina	30	S	S	R
Cefuroxima	30	S	S	R
Cloranfenicol	30	S	S	S
Clindamicina	2	S	S	R
Cefoxitina	30	S	R	-
Eritromicina	15	R	R	-
Gentamicina	10	S	S	-
Moxifloxacina	5	S	S	I
Nitrofurantoína	300	S	S	S
Sulfazotrim	25	R	R	I
Tetraciclina	30	S	S	S

Tabela 2. Perfil de sensibilidade das estirpes analisadas contra medicamentos sintéticos convencionais

R: Resistente, S: Sensível, I: Intermediário, - Não testado. De acordo com: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013).

Como observado na Tabela 2, muitos microrganismos já apresentam resistência a alguns antibióticos convencionais. Nesse sentido, comparando os resultados da Tabela 1 com a Tabela 2, é importante destacar que todas as amostras de mel apresentaram atividade antimicrobiana frente às cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis*. Deve-se levar em conta que os antibióticos convencionais são compostos sintéticos planejados para apresentarem ações específicas, enquanto o mel possui uma composição variável (TAJIK et al., 2009).

É importante ressaltar que os microrganismos selecionados são associados a diversos processos de infecção hospitalar (SANTOS, 2007; LICHTENFELS et al., 2011). Esses agentes patogênicos, desenvolveram resistência a muitos antibióticos sintéticos convencionais (PATERSON, 2006; PAYNE et al., 2007). Dentre estes o Gram-positivo *Staphylococcus aureus* é um dos mais habitualmente adquiridos e é particularmente problemático na pele e infecções de feridas, uma vez que surgiram estirpes resistentes à metilina e à vancomicina (CUI et al., 2006; GOLDSTEIN, 2007).

Um fator que deve estar relacionado às diferentes respostas dos méis (dimensão dos halos de inibição) frente aos microrganismos Gram-positivos neste trabalho é a diferente distribuição dos compostos fenólicos encontrados em todas as amostras, como o ácido rosmarínico, apigenina, crisina e caempferol (BANDEIRA et al., 2018). Esta distribuição de compostos está relacionada diretamente com origem floral do produto (MOLAN, 2006; HALAWANI; SHOHAYEB, 2011). Pois, por exemplo, ao lado do ponto de MS1/MC1 tem uma área aberta antropizada, e um campo de soja à \pm 2.000 m. Já o ponto MS2/MC2 foi localizado em uma floresta secundária, com elevada quantidade de castanheiras, a uma distância superior a 2.000 m de plantações agrícolas.

Apesar da proximidade entre as amostras M4, M5, M6, M7 e M8, é importante destacar que os solos e a vegetação amazônicos têm composição muito variável, o que influencia diretamente na composição do mel (BORSATO; CRUZ; ALMEIDA, 2009; AKUJOBI, 2010). Além disso, os méis coletados no período seco normalmente apresentaram maiores halos de inibição que os coletados no período chuvoso (Tabela 1), o que pode estar diretamente associado a maior variedade de espécies florais nesse período.

Deste modo, uma forma de se usar este produto corretamente seria selecioná-lo por análise laboratorial, favorecendo o seu uso indicado. Em alguns países esse processo de indicações terapêuticas pré-definidas já é utilizado, como na Nova Zelândia e Austrália, que vendem mel para uso em diversas indústrias, com conhecimento prévio de suas propriedades (KHAN et al., 2014).

As amostras de mel de abelha *Apis mellifera* foram analisadas para a determinação do MIC frente aos microrganismos teste sensíveis ao produto. Os resultados estão mostrados na Tabela 2.

	Amostras	Concentração mínima inibitória (% v/v)*	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Período Seco	MS1	12,5	12,5
	MS2	12,5	6,25
	MS3	12,5	12,5
	MS4	12,5	12,5
	MS5	12,5	12,5
	MS6	12,5	12,5
	MS7	12,5	12,5
	MS8	12,5	12,5
Período Chuvoso	MC1	100	50
	MC2	100	50
	MC3	100	50
	MC4	100	100
	MC5	100	25
	MC6	100	25
	MC7	100	50
	MC8	100	100
Controle	Ampicilina1	100	50
	Glicose2	R	65

Tabela 2. Concentração mínima inibitória para os méis testados frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*.

*Resultados em % de solução de mel (v/v). 1Ampicilina 100 µg mL⁻¹ requeridas para inibir os microrganismos avaliados. 265% (m/v). R: resistente.

As amostras do período seco apresentaram CMI de 12,5% (v/v), contra os Gram-positivos testados, exceto para a amostra MS2. No entanto, no período chuvoso, o valor do MIC variou entre as amostras, estando entre 25,0% e 100% (v/v). A solução de glicose somente inibiu o crescimento microbiano do *S. epidermidis* com MIC de 65,0% (m/v). Essa variação nos valores de MIC pode estar associada a maior variabilidade floral no período seco em relação ao chuvoso.

Os resultados de CMI encontrados nesta pesquisa foram semelhantes aos encontrados por Bueno-Costa et al. (2016) em amostras de mel do Rio Grande do Sul, Brasil. Blair et al. (2009) avaliaram o efeito antibiótico de um mel de grau médico (Medihoney®) contra oito espécies de agentes patogênicos com elevados níveis de resistência aos antibióticos convencionais, incluindo *S. aureus*, e encontraram a concentração mínima inibitória (MIC) variando de 4,0 a 14,8% (m/v) de solução de mel, que é uma concentração que pode ser mantida no ambiente da ferida.

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

De modo geral as amostras de mel de *A. mellifera* produzidos em Santarém são promissores no controle de microrganismos relacionados a casos clínicos com

potencial ação terapêutica.

Os microrganismos *E. coli* e *C. albicans* foram resistentes ao produto testado. No entanto, as cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* foram sensíveis à todas as amostras, mesmo sendo resistentes à alguns antimicrobianos convencionais, tendo os méis do período seco apresentado o MIC de valores mais baixos. Essa variação pode estar relacionada à quantidade e distribuição de compostos fenólicos no mel.

REFERÊNCIAS

AKUJOBI, C. O; NJOKU, H. O. **Bioassay for the determination of microbial sensitivity to Nigerian honey**. Global Journal of Pharmacology, v. 4, p. 36-40, 2010.

ALVAREZ-SUAREZ, J. M. et al. **Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds**. Food and Chemical Toxicology. v.48, n.8-9. p.2490-2499, 2010.

BANDEIRA, A. M. P. et al. **Antioxidant activity and physicochemical characteristics of honeys from the eastern Amazon region, Brazil**. Acta Amazonica. v.48, n.2, p.158-167, 2018.

BLAIR, S. E. et al. **The unusual antibacterial activity of medical-grade Leptospermum honey: antibacterial spectrum resistance and transcriptome analysis**. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, v. 28, n. 10, p.1199-1208, 2009.

BORSATO, D. M. et al. **Topical anti-inflammatory activity of a monofloral honey of Mimosa scabrella provided by Melipona marginata during winter in southern Brazil**. Journal of Medicinal Food, v.17, n.7, p. 817-25, 2014.

BORSATO, D. M.; CRUZ, M. C. R.; ALMEIDA, M. M. **Atividade antimicrobiana de méis comercializados na região dos Campos Gerais – Paraná**. Visão Acadêmica, Curitiba, v.10, n.1, p.48-53, 2009.

BUENO-COSTA, F. et al. **Antibacterial and antioxidant activity of honeys from the state of Rio Grande do Sul, Brazil**. LWT-Food Science and Technology, v.65, p.333-340, 2016.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial susceptibility Testing: Twenty-third Informational Supplement M100-S23**. CLSI, Wayne, PA, USA, 2013.

CUI, L. Z. et al. **Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy Journal, v.50, n.2, p.428-438, 2006.

DA CRUZ, C. B. N. et al. **Antimicrobial activity of honeys from two stingless honeybee species and Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae) against pathogenic microorganisms**. Acta Amazônica, v.44, n.2, p.287-290, 2014.

DA SILVA, P. M. et al. **Honey: Chemical composition, stability and authenticity**. Food Chemistry, v.196, n.1, p.309-323, 2016.

ESCUREDO, O. et al. **Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area**. Food chemistry, v.138, n.2, p.851-856, 2013.

GOLDSTEIN, F. **The potential clinical impact of low-level antibiotic resistance in Staphylococcus aureus**. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v.59, n.1, p.1-4, 2007.

- HALAWANI, E.; SHOHAYEB, M. **Survey of the antibacterial activity of Saudi and some international honeys**. Journal of Microbiology and Antimicrobials, v.3, n.4, p.94-101, 2011.
- KHAN, F. et al. **Antimicrobial properties and isotope investigations of South African honey**. Journal of applied microbiology, v.117, p.366-379, 2014.
- LICHTENFELS, E. et al. **Infecção em endoprótese**. Jornal Vascular Brasileiro, v.10, n.1, p.50-54, 2011.
- LUSBY, P. E.; COOMBES, A. L.; WILKINSON, J. M. **Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria**, Archives of Medical Research, v.36, n.5, p.464-467, 2005.
- MOLAN P. C. **The evidence supporting the Use of Honey as a Wound Dressing**. International Journal of Lower Extremity Wounds, v.5, n.1, p. 40–54, 2006.
- OVERGAAUW, P. A. M.; KIRSPENSTEIJN, J. **Application of honey in the treatment of skin wounds**. European Journal of Companion Animal Practice, v.16, n.1, p.17-19, 2006.
- PATERSON, D. L. **The epidemiological profile of infections with multidrugresistant *Pseudomonas aeruginosa* and Acinetobacter species**. Clinical Infectious Diseases, v.43, n.2, p.43-48, 2006.
- PAYNE, D. J. et al. **Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery**. Nature Reviews Drug Discovery, v.6, n.1, p.29-40, 2007.
- PERALTA, E. D. **Atividade antimicrobiana e composição química de méis do Estado da Bahia**. 2010. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, 2010.
- RAHMAN, M. M. et al. **Chemical composition and biological properties of aromatic compounds in honey: An overview**. Journal of food biochemistry, v.41, n.6, e12405, 2017.
- SANTOS, A. L. ***Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar**. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v.43, n.6, p.413-423, 2007.
- SLAMA, T. G. **Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay**. Critical Care, v.12, p.1-7, 2008. Supplement 4.
- TAJIK, H. et al. **Clinical and microbiological evaluations of efficacy of combination of natural honey and yarrow on repair process of experimental burn wound**. Journal of Animal and Veterinary Advances, v.8, n.5, p.907-911, 2009.
- TAVEIRA, M. et al. **Lycopersicon esculentum seeds: an industrial byproducts as an antimicrobial agent**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.58, n.17, p.9529- 9536, 2010.
- THAKUR, D. et al. **Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by Streptomyces sp. 201**. Journal de Mycologie Médicale, v. 19, n.3, p.161-167, 2009.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894 p.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA EM CEPAS DE LEVEDURAS ISOLADAS DE FRUTAS E BATATAS

Data de aceite: 10/12/2019

Rosimeire Oenning da Silva

Universidade do Estado de Mato Grosso Campus
Deputado Estadual Renê Barbour Faculdade de
Arquitetura e Engenharia Barra do Bugres MT

Karolay Amância de Jesus

Universidade do Estado de Mato Grosso Campus
Deputado Estadual Renê Barbour Faculdade de
Arquitetura e Engenharia Barra do Bugres MT

Nádia Maria de Souza

Universidade do Estado de Mato Grosso Campus
Deputado Estadual Renê Barbour Faculdade de
Arquitetura e Engenharia Barra do Bugres MT

Fabio Cristiano Angonesi Brod

Universidade do Estado de Mato Grosso Campus
Deputado Estadual Renê Barbour Faculdade de
Arquitetura e Engenharia Barra do Bugres MT

RESUMO: Enzimas produzidas industrialmente, como por exemplo as amilases estão entre as mais importantes na biotecnologia atual. A grande diversidade genética e metabólica de leveduras existentes na natureza nos dá a possibilidade de encontrar cepas com capacidade de secretar enzimas extracelulares com características interessantes. Diante disso, o objetivo desta pesquisa foi isolar e selecionar cepas de leveduras produtoras de enzimas extracelulares amilolíticas obtidas através

da microbiota presente em frutas e batatas adquiridas em supermercados do município de Barra do Bugres-MT. Para verificar a capacidade amilolítica das leveduras, as cepas foram inoculadas, em placas de Petri contendo meio YEPA (extrato de levedura, peptona e amido). As placas foram incubadas a 30 °C durante 5 dias. Após esse período foi realizado a sublimação do iodo para a revelação dos halos de degradação do amido. Aquelas leveduras que apresentaram índice enzimático (IE) maiores que 2,1mm foram selecionadas para posterior teste de fermentação submersa. Os resultados mostraram que dentre as leveduras avaliadas, 15 apresentaram atividade amilolítica em placa. Desses isolados, 8 apresentaram IE > 2,0 com destaque para cepas BBA01, BBA16, BBA18 e BB206 que atingiram IE de 4,8; 4,1; 2,8 e 2,7 respectivamente. Conclui-se, portanto, que existe grande potencial amilolítico em leveduras selvagens isoladas de batatas.

PALAVRAS-CHAVE: Amilases. Halos de Degradação. Índice Enzimático.

EVALUATION OF AMIOLITIC ACTIVITY IN YEAST ISOLATED OF FRUIT AND POTATOES

ABSTRACT: Industrially produced enzymes such as amylases are among the most important in today's biotechnology. The great genetic and metabolic diversity of yeasts in nature gives

us the possibility of finding strains capable of secreting extracellular enzymes with interesting characteristics. Therefore, the objective of this research was to isolate and select strains of yeast producing amylolytic extracellular enzymes obtained from the microbiota present in fruits and potatoes purchased in supermarkets in Barra do Bugres-MT. To verify the yeast amylolytic capacity, the strains were inoculated in Petri dishes containing YEPA medium (yeast extract, peptone and starch). The plates were incubated at 30 ° C for 5 days. After this period, iodine sublimation was performed to reveal starch degradation halos. Those yeasts with enzymatic index (IE) greater than 2.1mm were selected for subsequent submerged fermentation test. The results showed that among the evaluated yeasts, 15 presented plaque amylolytic activity. Of these isolates, 8 presented IE > 2.0, with strains BBA01, BBA16, BBA18 and BB206 striking IE 4.8; 4.1; 2.8 and 2.7 respectively. It is concluded, therefore, that there is great amylolytic potential in wild potato yeast isolates.

KEYWORDS: Amylases. Halos of Degradation. Enzyme Index.

1 | INTRODUÇÃO

As amilases são moléculas capazes de acelerar os processos químicos com grandes vantagens frente aos catalisadores químicos, principalmente por serem ecologicamente viáveis. A cada dia presenciamos mais processos industriais que utilizam enzimas como catalisadores, dentre as quais se destacam as enzimas nas áreas de alimentos, saúde humana e animal e bens como papel e celulose e indústria têxtil (Monteiro and Silva 2009). Enzimas produzidas através de organismos vivos são muito úteis e apresentam uma diversificada aplicação. Essas enzimas podem ser divididas em três classes: (a) enzimas técnicas (inclui enzimas para indústria de detergentes, indústrias de amidos, têxtil, etanol combustível e farmacêutica), (b) enzimas alimentares (enzimas para indústria da panificação, cervejeira, bebidas alcoólicas, laticínios e óleos) e (c) e enzimas para indústria de ração animal (Kumar *et al.* 2014).

As amilases estão entre as classes de enzimas alimentares de maior importância para a biotecnologia, pois apresentam grande versatilidade na indústria. Como por exemplo, na indústria de panificação, melhorando a cor e a maciez do produto final, e na produção de cervejas claras. Elas podem ser obtidas de diferentes fontes, incluindo plantas, animais e micro-organismos, sendo os fungos filamentosos e as bactérias os principais produtores (Selvan *et al.* 2016).

A demanda por alimentos de qualidade, atualmente é requerida pelos consumidores. Isso faz com que a indústria alimentícia busque desenvolver alimentos com ingredientes naturais usando a aplicação de enzimas industriais. Por este fato as enzimas (amilases, pectinases, xilanases, entre outras) são essenciais nas indústrias de aditivos alimentares (Keerti *et al.* 2014).

A bioprospecção de agentes produtores de enzimas é um dos campos mais promissores dentro da biotecnologia, pois agrega alto valor à produção em níveis

industriais de produtos de consumo humano, como também por representar a possibilidade de uso mais eficiente dos infinitos recursos naturais renováveis de todo o planeta. Devido ao potencial de gerar produtos e processos biotecnológicos e também por apresentarem tempo reduzido e menor custo na produção, diversidade genética e metabólica dos micro-organismos vem sendo explorada a milhares de anos (Farias 2008).

Diante do exposto, o presente trabalho de pesquisa teve como objetivo isolar e selecionar leveduras produtoras de enzimas extracelulares amilolíticas, obtidas a partir da microbiota presente em frutas e batatas coletadas em supermercados do município de Barra do Bugres - MT.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

A presente pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia da Universidade do Estado de Mato Grosso, Campus universitário Deputado Estadual Renê Barbour da cidade de Barra do Bugres, localizada no Estado de Mato Grosso, Brasil, (15°04'21" de latitude sul e a 57°10'52" de longitude oeste).

2.1 Isolamento, seleção e preservação das cepas

Para o isolamento das cepas, foram coletadas amostras das seguintes frutas: morgote (*Citrus aurantium X Reticulata var. murcote*), nectarina (*Prunus persica*, var. nucipersica), uva rubi (*Vitis vinífera*), uva niágara (*Vitis labrusca*), ameixa (*Prunus domestica*), manga (*Mangifera indica*), pêssego (*Prunus pérsica*), goiaba (*Psidium guajava*), pêra (*Pyrus comunis*), laranja-pêra (*Citrus sinensis* L. Osbeck). E de tubérculos como a batata inglesa (*Solanum tuberosum*) e batata doce (*Ipomoea batatas*). As frutas e tubérculos foram adquiridos em comércios locais do município de Barra do Bugres-MT. Para a obtenção de colônias isoladas, as amostras foram devidamente higienizadas e cortadas sendo pesados 10g de cada amostra e por fim, maceradas em liquidificador estéril contendo 90 mL de solução salina (NaCl) a 0,90 % p/v, com subseqüentes diluições em série. Em seguida, 100 µL de cada diluição foram semeados superficialmente em placas de Petri contendo meio de cultura YEPX (extrato de levedura (Oxoid - Thermo Scientific) 1%, peptona (Vetec) 2%, xilose (Dinâmica) 2% e ágar (Merck) com pH corrigido para 4,0, adicionado de ampicilina na concentração de 500 mg L⁻¹. As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas

Após o período de incubação, a seleção de cepas de leveduras obtidas das frutas se deu através de colônias estriadas em placas de Petri que continham YEPD (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose (Merck) 2% e ágar 2%) com pH 4,0. Em seguida, em torno de quatro a seis colônias por amostra foram selecionadas aleatoriamente sendo então, novamente repicadas para obtenção de culturas puras. Estas culturas puras foram preservadas para posterior avaliação de produção de amilase.

Para seleção das cepas a partir de batatas, o procedimento adotado foi de

forma direta. Após incubação em meio YEPA (extrato de levedura 1%, peptona 2%, ágar 2% e amido solúvel (Synth) 2%, com pH 6,0 as placas contendo a cultura mista, apresentando assim colônias mais separadas sendo tratadas com vapor de iodo e somente as colônias que apresentaram halo de degradação do amido foram selecionadas e purificadas.

As culturas puras foram preservadas em glicerol 15% em temperatura de -20°C. As mesmas cepas também foram mantidas a 4°C, em tubos inclinados contendo o meio YEPD com pH 4,0 de acordo com a técnica de Castellani (CASTELLANI, 1939).

2.2 Determinação do índice enzimático

Para verificar a capacidade amilolítica das cepas isoladas, as linhagens foram inoculadas com o auxílio de alça tipo agulha, em placas de Petri contendo meio YEPA composto por: extrato de levedura 1%, peptona 2%, ágar 2% e amido solúvel 2% com pH 6,0.

Placas contendo cinco linhagens foram incubadas a 30 °C por 5 dias. Após esse período as superfícies das placas foram tratadas com vapor de iodo para a revelação dos halos de hidrólise. As linhagens que apresentaram o halo de hidrólise foram utilizadas para determinação do índice enzimático de acordo a razão entre o diâmetro halo degradativo e o diâmetro da colônia (Souza et al., 2011).

As análises foram realizadas em duplicatas e apenas com aquelas que apresentaram halo de degradação repetiu-se quatro vezes o experimento.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamento das leveduras

A metodologia utilizada para o isolamento permitiu a obtenção de 68 cepas de leveduras, conforme disposto na Tabela 1.

Os resultados foram avaliados de acordo com a produção das enzimas pela presença (+) ou ausência (-) de atividade a partir de halos formados no meio de cultivo, ao redor da colônia. Além disso, foi mensurado o nível de degradação do substrato específico considerando, em milímetros, o diâmetro dos halos de degradação, sendo os resultados expressos através de índice enzimático (IE) que, por sua vez, expressa a relação entre o diâmetro médio do halo de atividade e o diâmetro médio da colônia correspondente (STAMFORD; ARAÚJO; STAMFORD, 1998).

Das 55 (cinquenta e cinco) cepas de leveduras isoladas de frutas e testadas para atividade amilolítica, 3.6% apresentaram resultados positivos para produção de amilase. Existem diversos fatores que podem ter contribuído para que a maioria das leveduras isoladas de frutas não terem apresentado atividade amilolítica, dentre eles: o meio de cultura, a temperatura que podem não ter sido o ideal para aquela determinada levedura, ou até mesmo a sua incapacidade de expressão e secreção de

amilases (VASCONCELOS et al., 2003).

Isolamento	Substrato de Isolamento	Nº de Leveduras isoladas	Designação das leveduras
Frutas	Morgote	05	BB.145 a BB.149
	Ameixa	05	BB.150 a BB.154
	Pêssego	04	BB.155 a BB.159
	Nectarina	05	BB.160 a BB.164
	Goiaba Vermelha	06	BB.165 a BB.170
	Uva rubi	05	BB.171 a BB.175
	Uva Niágara	03	BB.176 a BB.177
	Pera importada	05	BB.178 a BB.182
	Manga	09	BB.183 a BB.191
	Laranja Pera	05	BB.192 a BB.196
	Nectarina	03	BB.197 BB.204 BB.206
Tubérculos	Batata doce	12	BBA.01 BBA.02 BBA.03 BBA.04 BBA.05 BBA.12 BBA.15 BBA.16 BBA.17 BBA.18 BBA.19 BBA.21
	Batata inglesa	8	BBA.06 BBA. 24 BBA.06 BBA. 24 BBA.25 BBA. 26 BBA. 27 BBA. 28

Tabela 1: Designação das leveduras isoladas de frutas e tubérculos.

3.2 Determinação do índice enzimático das cepas isoladas de frutas e batatas

O baixo percentual de leveduras produtoras de amilases é demonstrado também em alguns trabalhos científicos: Landell et al., (2009) analisaram o perfil enzimático de linhagens de leveduras isoladas de bromélias e constatou que 13% apresentaram resultados positivos para amilase. Mautone (2008), ao isolar 175 leveduras de figueiras, obteve 30% de linhagens amilolíticas. Farias (2008), testaram 333 leveduras isoladas de solo de áreas preservadas no estado de Roraima e obtiveram somente 5% de linhagens com produção de amilase apresentando IE entre 0,98 a 3,4

Das 20 (vinte) leveduras isoladas de tuberculos 100% das provenientes de batata doce, e 25% das provenientes de batata inglesa apresentaram atividade amilolítica em placa. Do total de isoladas, oito apresentaram $IE \geq 2,0$ com destaque as leveduras BBA 01, BBA16, BBA18 e BB 206 que atingiram IE de 4,8 \geq 4,1 \geq 2,8 e 2,7 respectivamente.

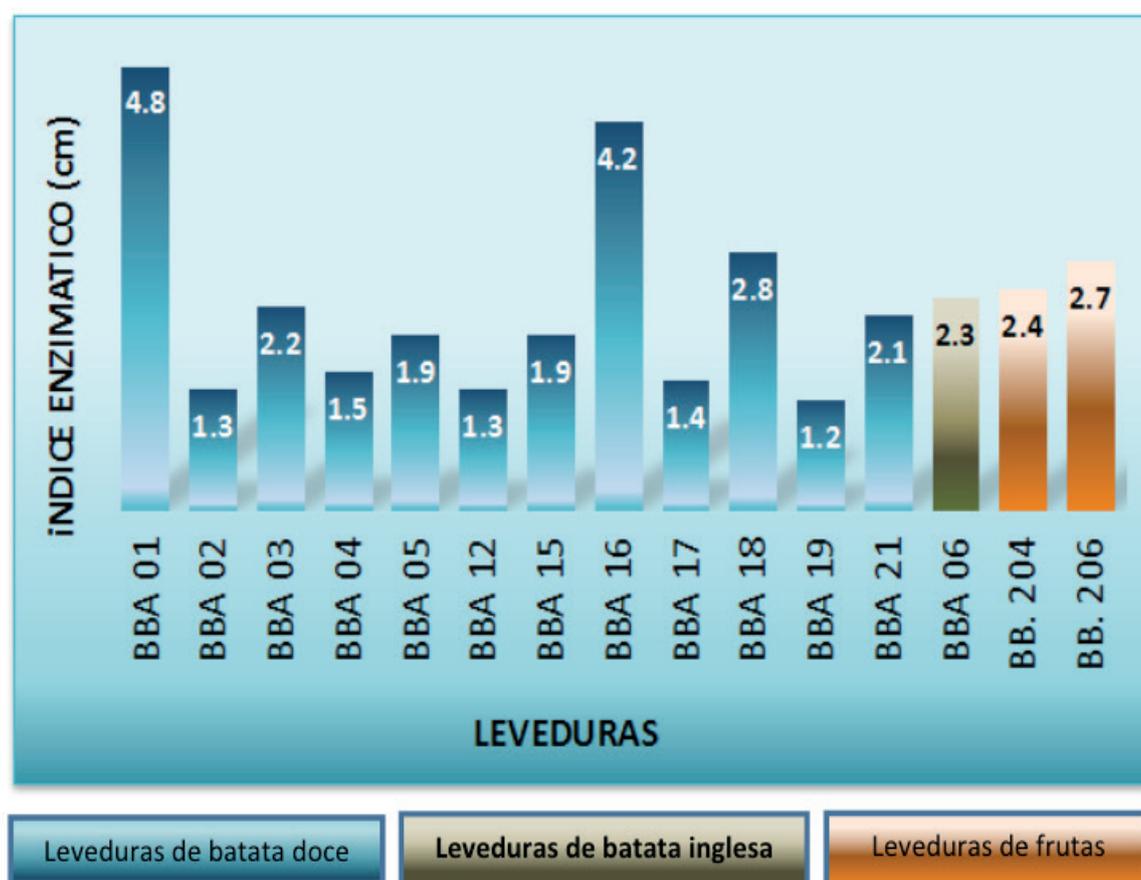


Figura 1: Índice enzimático de leveduras de frutas e batatas verificados pela observação e medição de halos de degradação do amido em placas utilizando iodo sublimado.

Segundo Lealem and Gashe (1994), para considerar um micro-organismo produtor de enzima ele deve apresentar um Índice Enzimático maior que 2,0. Os resultados da presente pesquisa corroboram com os encontrados por Silva e colaboradores (2009), que ao isolarem bactérias do feijão caupi obtiveram um índice enzimático $\geq 2,0$. Costa e colaboradores (2011) apresentaram dados semelhantes aos encontrados na presente pesquisa que ao isolar leveduras de batata-doce, obtiveram cepas com $IE \geq 2,1$. Alves

(2017) avaliou trinta e oito linhagens de micro-organismos sendo 15 bactérias e 23 leveduras. 12 isolados apresentaram atividade em meio com 0,2% de amido. Destes 4 são linhagens bacterianas e oito são linhagens de leveduras. Os isolados A5, B7, B10 e E4 se destacaram por apresentarem índices enzimáticos de 3,60, 2,78, 2,97 e 2,01 respectivamente.

Ao utilizar um meio de cultura contendo apenas amido como fonte de carbono exige que o micro-organismo inoculado produza enzimas extracelulares, uma vez que o amido não penetra na célula devido ao seu tamanho molecular. Para alguns micro-organismos, algumas enzimas não se dispersam no meio de cultura, permanecendo aderidas à parede celular e, conseqüentemente, não formam o halo de hidrólise (Giongo 2006; Gonçalves 2007).

A visualização do halo de degradação (Figura 2) também pode depender da presença de substâncias que interagem com o corante (resultando em falsos positivos e falsos negativos) ou com a enzima, inibindo sua ligação com o substrato (Neirotti and Azevedo 1988; Colen 2006). Outro fator relevante é que a atividade enzimática, pode sofrer interferência dos fatores físico-químicos como temperatura e pH (Sanomiya and Nahas 2003; Maccheroni *et al.* 2004).

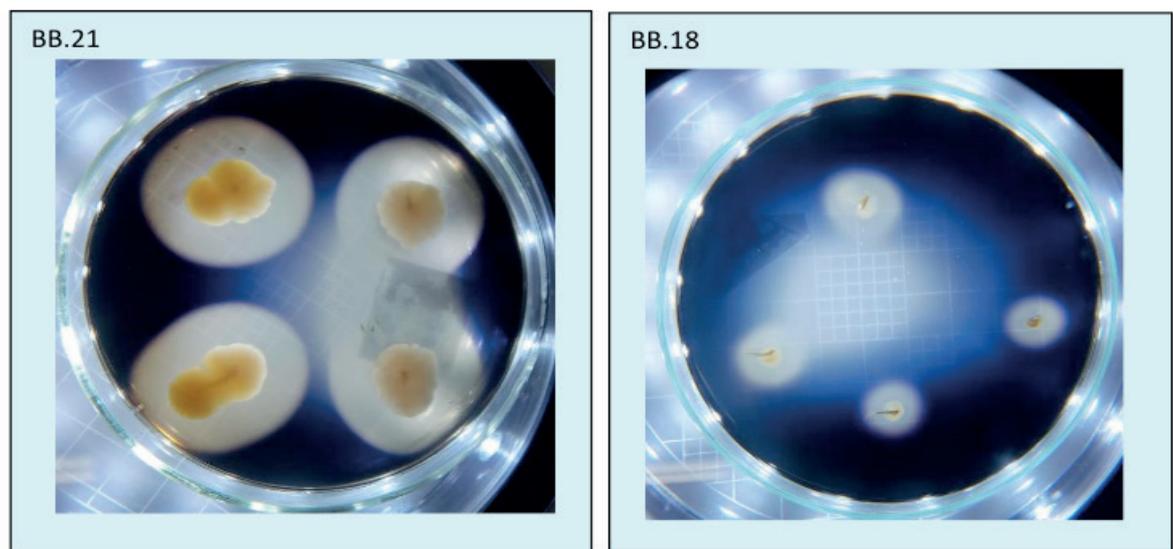


Figura 2: Halos de Atividade Amilolítica

4 | CONCLUSÃO

Os resultados indicaram que a batata doce é uma excelente fonte para o isolamento de leveduras com atividade amilolítica esse fato pode ser explicado pela batata ser uma fonte rica em amido, o que contribui para o desenvolvimento de uma microbiota adaptada na utilização deste substrato como fonte de carbono. Já as frutas por terem uma baixa quantidade de amido na sua composição limita o desenvolvimento de uma microbiota com atividade amilolítica.

REFERÊNCIAS

- Alves, M.M.S. 2017. **Potencial biotecnológico de bactérias e leveduras isoladas de casca de coco-verde (*Cocos nucifera*) em fermentação.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Alagoas. 156 p.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 4th ed. Washington, 2001. Disponível em: <<http://ajph.aphapublications.org/doi/book/10.2105/MBEF.0222>>. Acessado em 7 de jan de 2018.
- Bradford, M.M. 1976. **A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Colen, G. 2006. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases.** 206p. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais. 206p.
- Costa, S.T.; Abreu-Lima, T.L.; Carreiro, S.C. 2011. **Atividade amilolítica de leveduras isoladas de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam).** *Revista de Biociências da Universidade de Taubaté*, 17: 15-24.
- Farias, M.V. 2008. **Produção de enzimas hidrolíticas por leveduras isoladas de solos de áreas preservadas em Roraima, Brasil.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, Roraima. 116p.
- Giongo, J.L. 2006. **Caracterização e Aplicação de proteases Produzidas por Linhagens de *Bacillus sp.*** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 81p.
- Gonçalves, F.A.G. 2007. **Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais. 67p.
- Kumar, V.; Singh, D.; Sangwan, P; Gill, P K. 2014. Global market scenario of industrial enzymes. In: *Industrial Enzymes.* Nova Science Publishers. New York. p. 173-196.
- Landell, M. F.; Inácio, J.; Fonseca, A.; Vainstein, M. H.; Valente, P. 2009. **Cryptococcus bromeliarum sp. nov., an orange-coloured basidiomycetous yeast isolated from bromeliads in Brazil.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59: 910-913.
- Lealem, F.; Gashe, B.A. 1994. **Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef. (*Eraglostis tef.*).** *Journal of Applied Bacteriology*, 77: 348-352.
- Maccheroni Junior, W.; Araújo, W.L.; Azevedo, J.L. 2004. **Ambient pH-regulated enzyme secretion in endophytic and pathogenic isolates of the fungal genus *Colletotrichum*.** *Scientia Agricola*, 61: 298-302.
- Mautone, J.N. 2008. **Diversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de folhas de figueiras do parque Itapoá – RS, Brasil.** Dissertação de Mestrado, PUCRS, Porto Alegre. 124p.
- Monteiro, V.N.; Silva, R.N. 2009. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. *Revista Processos Químicos*, 3:9-23.
- Neirotti, E.; Azevedo, J.L. 1988. **Técnica semi quantitativa de avaliação da produção de celulases em *Humicola sp.*** *Revista de Microbiologia*, 19: 78-81.
- Sanomiya, L.T.; Nahas, E. 2003. **Micro-organismos produtores de hidrolases envolvidos nas transformações dos compostos do carbono e do nitrogênio do solo.** *Revista Ciência Rural*, 33:

835-842.

Souza, H.Q.; Oliveira, L.A.; Andrade, J.S. 2011. **Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28: 116-124.

Vasconcelos, W.E.; Rios, M. S.; Sousa, A.H.; Medeiros, E.V.; Silva, G.M.C.; Maracajá, P.B. 2003. **Caracterização bioquímica e enzimática de *Cunninghamella* isoladas de manguezal.** *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, 2003.

Wanderley, K.J.; Torres, F.A.G.; Moraes, L.M.P.; Ilhoa, C.J. 2004. **Biochemical characterization of α -amilase from yeast *Cryptococcus flavus*** *FEMS Microbiol Lett*, 231: 165-160.

Whitaker, J.R. 1994. ***Principles of enzymology for the food sciences.*** New York: Marcel Dekker, 625 p.

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE UMA CERVEJA TIPO PILSEN COM ADIÇÃO DE CHÁ VERDE NA ETAPA DE MATURAÇÃO

Data de submissão: 24/10/2019

Data de aceite: 10/12/2019

Thaís Cardozo Almeida

Universidade de Vassouras, Engenharia Química

Vassouras – RJ

<http://lattes.cnpq.br/3398159166435638>

Natália Pinto Guedes de Moraes

Universidade de Vassouras, Engenharia Química

Vassouras – RJ

<http://lattes.cnpq.br/5214285565559668>

Tatiana da Silva Sant’Ana

Universidade de Vassouras, Engenharia Química

Vassouras – RJ

<http://Lattes.cnpq.br/1525058176124014>

Yorrana Lopes de Moura da Costa

Universidade de Vassouras, Engenharia Química

Vassouras – RJ

<http://lattes.cnpq.br/0680082199454956>

Luana Tashima

Universidade de Vassouras, Farmácia

Vassouras – RJ

<http://lattes.cnpq.br/3013630471299099>

Ligia Marcondes Rodrigues dos Santos

Universidade de Vassouras, Engenharia Química

Vassouras – RJ

<http://lattes.cnpq.br/7015155303932693>

base de malte de cevada e adicionada de lúpulo, que atua como fonte de amargor e aroma. Seu processo produtivo engloba, principalmente, as etapas de: produção do mosto, fermentação, maturação, filtração e envase. Assim como se almeja a qualidade sensorial da cerveja, também é necessário o controle da atividade microbiológica da mesma, pois a cerveja, como qualquer bebida fermentada, é um produto microbiano. Um dos meios de controle de tal atividade é a adição do lúpulo, que é uma planta com propriedades bacteriostáticas. O presente trabalho teve por objetivo a análise da qualidade microbiológica de uma cerveja tipo Pilsen, produzida na Cervejaria Escola da Universidade de Vassouras, com a adição de chá verde em substituição parcial ao lúpulo, em concentrações de 1,1 e 2,1 g/L, na etapa de maturação, visto que o chá verde apresenta semelhanças ao lúpulo, como odor aprazível, sabor amargo e efeito antimicrobiano. Foram feitas análises microbiológicas de bactérias totais e bactérias lácticas, estas últimas sendo as principais contaminantes da cerveja, obtendo-se resultados satisfatórios para ambas, o que validou a eficiência do chá verde no controle de tais microorganismos, em comparação a uma cerveja sem adição deste chá.

PALAVRAS-CHAVE: Cerveja; Chá verde; Microbiologia.

RESUMO: A cerveja é uma bebida fermentada a

MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF A PILSEN BEER WITH GREEN TEA ADDITION AT THE MATURATION STAGE

ABSTRACT: Beer is a barley malt fermented beverage with hops addition, which acts as a source of bitterness and aroma. Its production process includes, mainly, the stages of: wort production, fermentation, maturation, filtration and filling. Just as the sensory quality of beer is desired, it is also necessary to control its microbiological activity, because beer, like any fermented beverage, is a microbial product. Aiming to control such activity is the addition of hops, which is a plant with bacteriostatic properties. The objective of the present study was to analyze the microbiological quality of a Pilsen beer produced in the Brewery School of the Universidade de Vassouras, with the addition of green tea in partial replacement of hops, in concentrations of 1,1 and 2,1 g/L, in the maturation stage, since green tea has similarities to hops, such as pleasant odor, bitter taste and antimicrobial effect. Microbiological analyzes of total bacteria and lactic acid bacteria were made, the latter being the main contaminants of beer, obtaining satisfactory results for both, which validated the efficiency of green tea in the control of such microorganisms, compared to a beer without the addition of this tea.

KEYWORDS: Beer; Green tea; Microbiology.

1 | INTRODUÇÃO

Como explica Meussdoerffer (2009) e Dantas (2016), a cerveja é uma bebida alcoólica extremamente valorizada comercialmente graças à qualidade de suas propriedades físico-químicas e à sua relação com a tradição e cultura de cada civilização que a consome, sendo considerada uma das cinco bebidas mais consumidas no mundo.

Caracterizada por uma alta concentração de carboidratos e presença de proteínas, aminoácidos, vitaminas, ácidos orgânicos, mais de trinta micro e macro elementos diferentes e uma gama de antioxidantes, a cerveja é considerada um produto de valor nutritivo (BELSCAK-CVITANOVIC et al., 2016).

Dentro da fábrica de cerveja, o processo de produção envolve a moagem do malte, mosturação, clarificação do mosto, fervura, resfriamento do mosto, fermentação, maturação, filtração e envase (SIQUEIRA, 2008).

Logo após o processo de fermentação principal, inicia-se a etapa de fermentação secundária. Tal etapa relaciona-se ao período de maturação da cerveja. A maturação é realizada sob temperaturas baixas e é importante para a clarificação da cerveja, como também a melhoria de seu sabor e odor (SIQUEIRA, 2008).

A cerveja, como qualquer bebida fermentada, é um produto microbiano. A atividade microbiana está envolvida em algumas etapas de sua produção, definindo as muitas características sensoriais que contribuem para qualidade final. Tendo isto em mente, é importante a realização de análises microbiológicas durante o processo de produção da cerveja, visando o controle da atividade de microrganismos e garantindo

assim a fabricação de uma cerveja de qualidade (BOKULICH, 2013).

O lúpulo, como explicam Martins et al. (2014) e Silva et al. (2016), é uma planta trepadeira, que dá origem a flores, e é considerado uma erva com propriedades medicinais, usada como antibiótico e anti-inflamatório. Para a indústria cervejeira, o interessante são as flores femininas não fecundadas, pois estas possuem lupulina. Na cerveja, o lúpulo tem função aromática e é ele que propicia o sabor amargo. O estudo das propriedades de alguns compostos presentes no lúpulo revelou efeitos bioativos em grande parte de seus metabólitos.

Nos últimos anos, os esforços da indústria alimentícia estão focados em adequar as tendências de consumo a produtos mais naturais, obtidos usando matérias-primas naturais para enriquecer produtos convencionais com diversos substratos naturais ou extratos, visando proporcionar benefícios terapêuticos e fisiológicos. A utilização de chá verde como uma substituição parcial do lúpulo no processo de fabricação de cerveja é algo já em processo de estudo devido a algumas similaridades entre estes dois compostos (BELSCAK-CVITANOVIC et al., 2016; DIAS, 2014; RODRÍGUEZ, 2017).

Segundo Cabrera (2006), tendo sua origem de produção na China, o chá é produzido em mais de 20 países e é a bebida mais consumida no mundo depois da água, devido aos seus benefícios à saúde e às suas características sensoriais, estimulantes, relaxantes e propriedades culturais, estando bem à frente do café, cerveja, vinho e refrigerante. O chá verde, desde os tempos antigos, é considerado pela medicina tradicional chinesa como uma bebida saudável.

Ao comparar o lúpulo com o chá verde, observa-se uma semelhança no que diz respeito à sua coloração esverdeada, odor apazível e sabor amargo. Além destes comparativos, também é válido ressaltar que ambos possuem efeito antimicrobiano, o que propicia uma diminuição da contaminação da cerveja. Devido a tais semelhanças, a substituição parcial do lúpulo por chá verde se torna uma opção interessante no processo cervejeiro (SCHUINA et al., 2015).

Assim, neste estudo buscou-se substituir parcialmente o lúpulo por chá verde, em concentrações de 1,1 e 2,1 g/L, em cervejas do tipo Pilsen produzidas na Cervejaria Escola da Universidade de Vassouras, analisando então a qualidade microbiológica deste chá.

2 | MATERIAL E MÉTODO

2.1 Produção da cerveja

A cerveja foi produzida na Cervejaria Escola da Universidade de Vassouras, utilizando as matérias-primas contidas na Tabela 1. O mosto foi adicionado em 6 fermentadores previamente higienizados contendo 7,5 litros cada um. Após o resfriamento, foi adicionada a levedura cervejeira e a cerveja foi colocada para

fermentar em um ambiente com 20°C. Diariamente foram coletadas amostras para medição de extrato e álcool.

MATÉRIAS-PRIMAS	
Água Primária	52 L
Água Secundária	39 L
Malte Pilsen	16 kg
Lúpulo Magnum®	8,477 g
Levedura Nottingham®	3,75 g
Chá Verde	1,1 e 2,1 g/L

Tabela 1 - Matérias-primas utilizadas para a produção da cerveja

Após o término da fermentação, a cerveja foi colocada para maturar a uma temperatura aproximada de 0°C. Neste momento houve a adição de chá verde nos fermentadores nas concentrações de 0, 1,1 e 2,1 g/L. A maturação foi acompanhada durante 10 dias.

2.2 Análises físico-químicas

Para a análise de extrato diária, foi utilizado o método segundo EBC (1998) onde uma amostra de aproximadamente 100 mL de cada balde foi retirada, tendo sua densidade medida por um densímetro, sendo esse valor depois convertido para graus plato (°P), de acordo com a tabela contida no método. Esse procedimento foi realizado até que os valores de extrato se mantiveram constantes, o que indicou o fim da fermentação.

Para a análise de álcool foi utilizado o método do Instituto Adolfo Lutz (2008), método este empregado na determinação do teor de álcool em volume, utilizando valores obtidos pela medição em densímetro, nas amostras de cerveja, seguindo uma tabela de conversão de densidade relativa a 20°C/20°C (INSTITUTO ADOLF LUTZ, I.A.L., 2008).

2.3 Análises microbiológicas

As coletas para análise microbiológica foram retiradas no primeiro, quinto e décimo dia de maturação. Foram feitas análises de bactérias totais e lácticas utilizando os meios de cultura PCA (*Plate Count Agar*) e MRS (*deMan, Rogosa e Sharpe*), respectivamente, de acordo com o método descrito por Silva *et al.*(2017).

As análises do presente estudo foram realizadas seguindo o método *pour plate*, que, segundo Machado (2004), é uma técnica geral para quantificação de microrganismos que pode ser utilizada para bactérias heterotróficas como também para a contagem de outros grupos de microrganismos e se baseia na premissa de que cada célula microbiana presente em uma amostra, quando fixada em um meio de cultura sólido adequado, irá formar uma colônia visível e isolada.

Vale ressaltar que, para as placas com o meio MRS, ainda foi feita mais uma cobertura com o meio para garantir um ambiente com pouco oxigênio, propício para crescimento das bactérias lácticas. As análises foram feitas em triplicata, para cada um dos meios e as placas encubadas a 37°C, por 48 horas para PCA e 72 horas para MRS.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Produção da cerveja

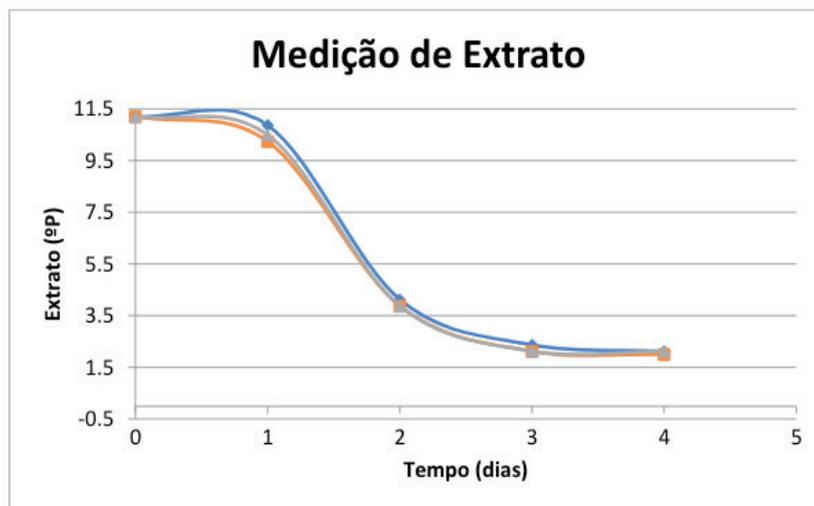


Gráfico 1 - Valores de extrato (°P) durante a fermentação antes da adição do chá verde. Fermentadores com concentração de chá verde após a maturação de 0 g/L (®), 1,1 g/L (n) e 2,1 g/L (p).

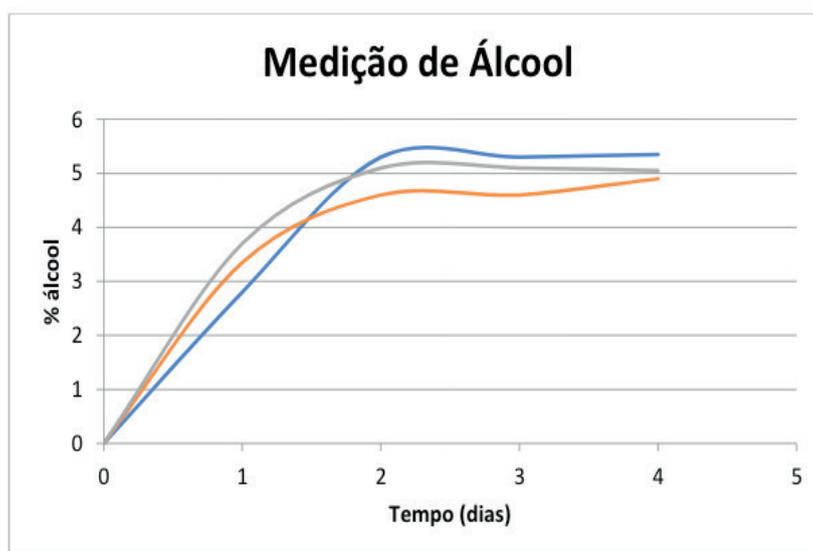


Gráfico 2 - Valores de teor alcoólico (%v/v) durante a fermentação antes da adição do chá verde. Fermentadores com concentração de chá verde após a maturação de 0 g/L (®), 1,1 g/L (n) e 2,1 g/L (p).

Ao analisar os resultados do Gráfico 1, que ilustra o decaimento do valor de extrato (°P) no decorrer do tempo de fermentação da cerveja, é possível observar

que as amostras tiveram início de queda de extrato já no primeiro dia de fermentação, partindo do valor inicial de 11,2 °P, medido após a etapa de fervura, e chegando ao valor constante de aproximadamente 2 °P ao final da etapa de fermentação.

Pela análise do Gráfico 2, que ilustra o crescimento na porcentagem de álcool das amostras estudadas, também foi possível constatar a formação do álcool pelas leveduras já no primeiro dia de fermentação, como consequência do decaimento do extrato. As amostras atingiram em torno de 5% de álcool no último dia de fermentação. De acordo com Rosa e Afonso (2014), a cerveja tipo Pilsen é composta por 2 a 6% de extrato residual, 2 a 6% de álcool, o que indica que a cerveja produzida no presente trabalho estava dentro das especificações.

Ambas as medições de extrato e de álcool ocorreram como o esperado, pois houve similaridades no decaimento do extrato e no aumento de álcool em todas as amostras, ou seja, todas as amostras começaram com o mesmo valor de álcool e extrato e terminaram também com aproximadamente o mesmo valor para ambos. Com isso é possível afirmar que a etapa de fermentação ocorreu de forma esperada e as amostras em questão estavam naquele momento prontas para seguirem à etapa de maturação. Além disso, com a obtenção destes resultados, também foi possível afirmar que não houve outros interferentes no meio, como açúcares, o que ocasionaria em um valor de álcool mais baixo ao final da fermentação e, conseqüentemente, poderiam acarretar em contaminação bacteriana nas amostras.

Vale ressaltar também que a adição de chá verde ocorreu somente na etapa de maturação, portanto não houve nenhum tipo de interferência causada pelo mesmo durante a etapa de fermentação do mosto.

3.2 Análises Microbiológicas

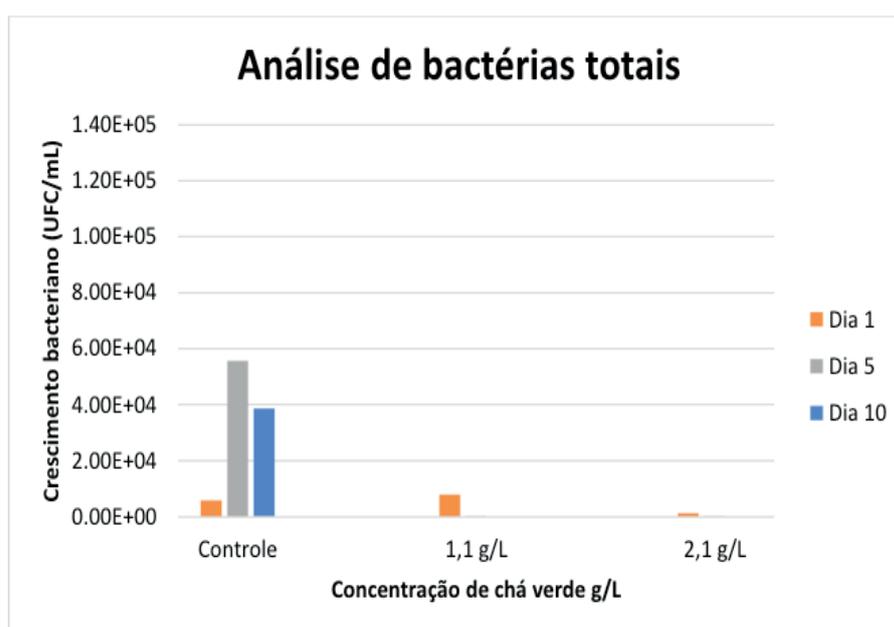


Gráfico 3 - Análise de bactérias totais utilizando meio de cultura PCA; Amostra controle com 0 g/L de chá verde adicionado; Em laranja o primeiro dia, em cinza o quinto dia e em azul o décimo dia de maturação.

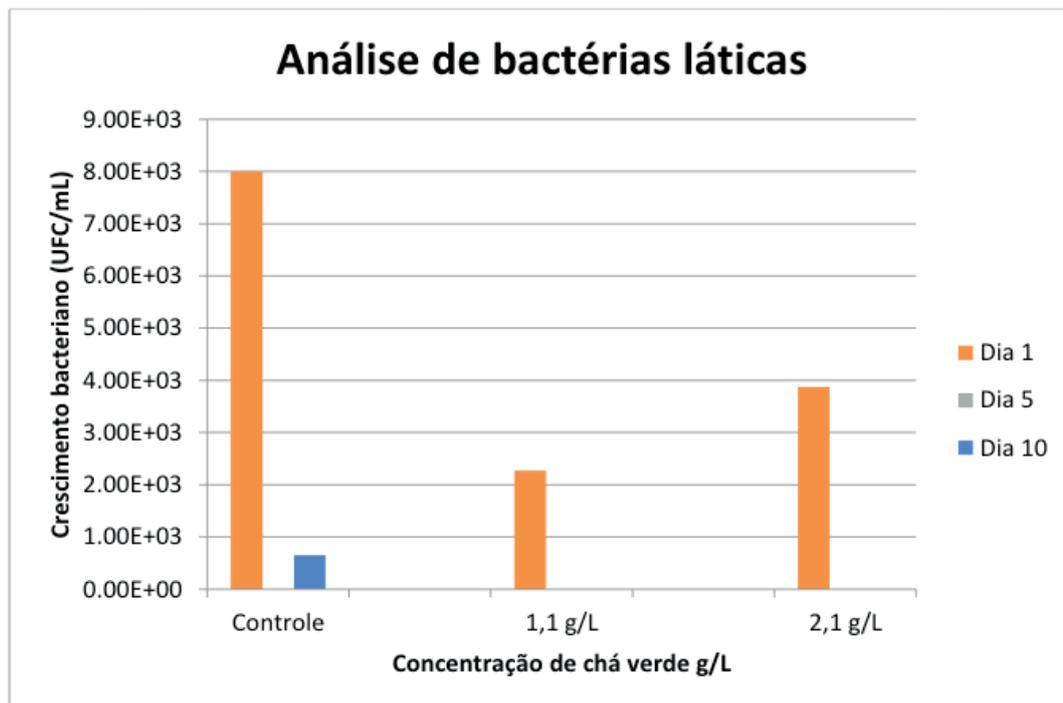


Gráfico 4 - Análise de bactérias lácticas utilizando meio de cultura MRS; Amostra controle com 0 g/L de chá verde adicionado; Em laranja o primeiro dia, em cinza o quinto dia e em azul o décimo dia de maturação.

Para a contagem de bactérias totais, foi utilizado o meio de cultura PCA, meio este empregado por Pontes *et al.*(2010) em seus estudos, para a contagem de bactérias totais em alimentos, bebidas, entre outros materiais, sendo de grande importância para a medição do nível de contaminação bacteriana nas amostras analisadas.

Ao analisar o Gráfico 3, observa-se que no primeiro dia de análises houve pequeno crescimento bacteriano em todas as amostras, o que pode ser explicado pelo fato de que o mosto foi fervido e com isso, boa parte dos microrganismos foi eliminada. Durante a fermentação, possivelmente as leveduras foram capazes de inibir o crescimento de contaminações durante o período em que estiveram ativas, por estarem bem adaptadas ao meio mais ácido em que se encontram (KLIEMANN, 2014).

Segundo Carvalho (2001), se o meio em que as leveduras estão inseridas restringem o seu crescimento, as bactérias, principalmente as lácticas, possuem um ambiente mais propício para seu crescimento. Portanto, somente na etapa de maturação, onde as leveduras já não estão mais ativas, o crescimento de bactérias começou a ser significativo. Também foi possível observar que a primeira coleta foi feita logo após adição do chá verde, portanto não foi o suficiente para que ele pudesse agir sobre os microrganismos presentes, o que explica o crescimento bacteriano mesmo nas amostras com o chá verde. A partir do dia 5 pode-se observar um decréscimo, sendo este nulo no décimo dia de coleta para as amostras que possuíam o chá verde, enquanto que o crescimento bacteriano permaneceu na amostra controle, o que indica que o chá verde atuou como um inibidor do crescimento bacteriano nas amostras que

o continham.

Para a contagem de bactérias lácticas, foi utilizado o meio de cultura MRS, meio este empregado por Jatobá *et al.* (2008) em seus estudos, para o cultivo de lactobacilos, possuindo também grande importância para a medição de bactérias lácticas nas amostras estudadas.

Ao analisar o Gráfico 4, observa-se que no primeiro dia de análise houve um alto crescimento em todas as amostras, o que pode ser explicado pelo ambiente mais propício para a proliferação dessas bactérias, já que as leveduras não estavam mais ativas. Com o decorrer do experimento, o crescimento das bactérias lácticas apresentou um decréscimo, atingindo um ponto, durante o décimo dia de análise, em que somente a amostra controle apresentou proliferação das mesmas, o que indica que o chá verde possuiu um efeito inibidor também para estas bactérias.

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com o observado no presente trabalho, conclui-se que as cervejas produzidas apresentaram um desenvolvimento parecido, garantindo assim uma maior precisão na análise final dos resultados, que se mostraram satisfatórios.

Em relação à substituição parcial do lúpulo pelo chá verde, onde o objetivo foi analisar a eficiência do chá verde como inibidor de crescimento de bactérias totais e lácticas, foi possível concluir que o chá verde, nas concentrações de 1,1 e 2,1 g/L, se mostrou eficiente nas amostras que o continham, apresentando um decréscimo até o valor nulo para todas as amostras onde houve a adição do chá. Este dado se torna ainda mais interessante, pois o chá verde apresenta características benéficas à saúde e também delega notas de amargor à cerveja.

REFERÊNCIAS

BELSCAK-CVITANOVIC, A.; et al. **Modification of functional quality of beer by using microencapsulated green tea (*Camellia sinensis* L.) and *Ganoderma* mushroom (*Ganoderma lucidum* L.) bioactive compounds**. Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly, v. 23, n. 4, p. 457–471, 2016.

BOKULICH, N. A.; BAMFORTH, C. W. **The Microbiology of Malting and Brewing**. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 77, n. 2, p. 157–172, 2013.

CABRERA., C.; R., A.; R., G. **Beneficial effects of green tea - A review**. Journal of the American College of Nutrition, v. 25, n. 2, p. 79–99, 2006.

CARVALHO, R. S.; **Interações entre leveduras e bactérias durante a fermentação alcoólica**. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP, 2001.

DANTAS, V. N. a **Trajetória Da Cultura Cervejeira E Sua Introdução No Brasil**. 2016.

DIAS, J.; **Desenvolvimento e avaliação de uma cerveja contendo chá amargo como substituinte de 50% do lúpulo**. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade de São Paulo, 2014.

EBC-European Brewery Convention. **Analytica-EBC/ European Brewery Convention**. Issued by the Analysis Committee-Nurnberg: Carl, Getränke-Fachverl: Grundwerk, 1998.

INSTITUTO ADOLF LUTZ, I.A.L. **Normas Analíticas do Instituto Adolf Lutz, Métodos físicos e químicos para análises de alimentos**. 4^o ed. ed. São Paulo: [s.n.], v. 1, 2008.

JATOBÁ, A., VIEIRA, F. N., NETO, C. B., SILVA, B. C., MOURIÑO, J. L. P., JERÔNIMO, G. T., DOTTA, G., MARTINS, M. L.; **Utilização de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato intestinal de tilapia-do-nilo como probiótico**. Pesq. agropec. bras., v.43, n.9, p.1201-1207, Brasília, 2008.

KLIEMANN, N. C.; **Monitoramento das dicetonas vicinais durante o processamento da cerveja**. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2014.

MACHADO, C. F.; **Avaliação da presença de microrganismos indicadores de contaminação e patogênicos em líquidos lixiviados do aterro sanitário de belo horizonte**. Dissertação de Pós-Graduação - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 2004.

MARTINS, I. F. et al. **Processo de produção da cerveja**. Realização II Simpósio de Assistência Farmacêutica Local: Centro Universitário São Camilo, 2014.

MEUSSDOERFFER, F. G. **Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets - 1. A Comprehensive History of Beer Brewing**. [s.l: s.n.].

PONTES, L. M. F., VIEIRA, A. D. S., NETO, A. D. B., CISNE, M. F., NETO, J. G. S., SANTOS, V. W. S., SILVA, L. M. F., SANTIAGO, L. B., SANTOS, K. M. O.; **Bactérias mesófilas totais em leite pasteurizado processado por um laticínio na cidade de Sobral-CE**. Universidade Estadual Vale de Acaraú – UVA, 2010.

RODRÍGUEZ, D. C. T., CASTAÑO, D. B.; **Sustitución parcial del lúpulo (*Humulus lupulus*) por cidrón (*Aloysia citrodora*) en la elaboración de cerveza artesanal**. Universidad de La Salle – Bogotá, 2017.

ROSA, N. A.; AFONSO, J. C.; **A química da cerveja**. Química e Sociedade. v. 37, n. 2, p. 98-105, 2015.

SCHUINA, G. L. et al. **Avaliação do potencial de utilização de chá verde como substituto parcial ou total de lúpulo em cerveja tipo pilsner**. p. 1–6, 2015.

SILVA, H. A. et al. **Cerveja e sociedade**. Revista de Comportamento, Cultura e Sociedade, v. 4, n. 2, p. 85–91, 2016.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V. C. A., SILVEIRA, N. F. A., TANIWAKI, M. H., GOMES, R. A. R., OKAZAKI, M. M.; **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água** [livro eletrônico] – 5. ed. – São Paulo : Blucher, 2017.

SIQUEIRA, P. B.; BOLINI, H. M. A.; MACEDO, G. A. **O processo de fabricação da cerveja e seus efeitos na presença de polifenóis**. Alimentos e Nutrição, v. 19, n. 4, p. 491–498, 2008.

BOTULISMO NO BRASIL: PREVENÇÃO E CAUSA

Data de aceite: 10/12/2019

Michele Reis Medeiros

<http://lattes.cnpq.br/7979182470276960>

Ana Luiza do Rosário Palma

Orientadora

<http://lattes.cnpq.br/3069029354915246>

Maria Juciara de Abreu Reis

Coordenadora do curso de nutrição

<http://lattes.cnpq.br/1657509975296528>

RESUMO: Com o passar dos anos os surtos alimentares cresceram, porém, atualmente existe um maior conhecimento sobre os mesmos, o que possibilita um rápido tratamento impedindo a evolução de danos maiores a saúde. Os números de casos registrados de Botulismo continuam crescendo, o que se faz questionar se realmente as pessoas estão levando a sério os cuidados que elas devem tomar ao alimentar-se de qualquer alimento e em qualquer lugar. O objetivo dessa pesquisa é expor o número de casos registrados e o número de óbitos causados pela bactéria *Clostridium botulinum*, bem como seus respectivos alimentos, alertando sobre a importância da prevenção ao consumir

alimentos de procedências não confiáveis, pois acredita-se que o leitor possa ter cuidados especiais ao ter acesso aos números de casos e assim, confirmar que, eles acontecem com frequência. A pesquisa realizada teve caráter quantitativo. Foram analisadas tabelas com informações pertinentes ao assunto e através dessas informações foram criados gráficos e respectivamente analisados gerando resultados. Verificou-se que os números de óbitos por botulismo não são muito grandes em comparação com a população residente do Estado, porém, os números de casos registrados continuam aumentando gradativamente.

PALAVRAS-CHAVE: Botulismo. Óbitos. *Clostridium botulinum*.

BOTULISM IN BRAZIL: PREVENTION AND CAUSE

ABSTRACT: Over the years, food outbreaks have grown, but now there is a greater knowledge about them, which allows a quick treatment preventing the evolution of major health damage. The number of reported cases of Botulism continues to rise, which raises the question of whether people are really taking the precautions they should take when feeding on any food anywhere. The objective of this research is to expose the number of cases registered and the number of deaths caused by

the bacterium *Clostridium botulinum*, as well as their respective foods, alerting about the importance of prevention when consuming food from unreliable sources, as it is believed that the reader can take special care when accessing case numbers and thus confirm that they happen frequently. The research was quantitative. Tables were analyzed with information relevant to the subject and through this information were created graphs and respectively analyzed generating results. The number of deaths from botulism was not found to be very large compared to the resident population of the state, however, the number of registered cases continues to increase gradually.

KEYWORDS: Botulism. Deaths. *Clostridium botulinum*

1 | INTRODUÇÃO

Em dias atuais o número DTAS (Doenças transmitidas por alimentos) cresceu, e segundo a ONU (Organização Mundial de Saúde) as DTAS contaminam 600 milhões de pessoas por ano, levando a óbito pelo menos 420 mil pessoas. Uma DTA conhecida, porém, não muito divulgada é o Botulismo, sendo assim, o tema desse artigo. O Botulismo é uma doença adquirida através de alimentos contaminados pelo esporo da bactéria *Clostridium botulinum* trazendo muito desconforto para o afetado, podendo ser tratada sem deixar sequelas se for identificada no início.

Sabe-se sobre o risco do consumo de maionese armazenada fora da geladeira, salpicão e outras preparações que levam ovo em sua receita. Existem casos de surtos de pessoas que comeram em um estabelecimento e depois todas elas ou a maioria tiveram que visitar o hospital, o diagnóstico quase sempre é intoxicação alimentar. Mas foi avisado sobre os riscos de comer alimentos enlatados por exemplo? Ou embutidos? Ou conservados? Diante desses questionamentos os consumidores podem imaginar o que realmente está por trás de alimentos industrializados, podendo se confundir, pois a salmoura se faz presente em alimentos enlatados para conservar os alimentos. É de grande importância lembrar que os enlatados, conservas, embutidos, como é o caso da sardinha em lata, atum em lata, pêssego em calda, tofu em conserva, linguiça, salsicha, picles, mortadela, ovo em conserva, presunto, também podem estar contaminados. Alimentos in natura também podem oferecer riscos à saúde se não manipulados e higienizados corretamente, como é o caso de carnes no geral, legumes, verduras entre outros. Esses alimentos são alguns dos que podem estar contaminados com o esporo da bactéria *Clostridium Botulinum*. Pode – se pensar que o consumo de alguns dos alimentos em si mencionado acima pode trazer riscos, surgindo a ideia de que para evitar a contaminação não devemos ingerir o alimento puro. Nesse artigo podemos observar que muitos alimentos mencionados pelo Ministério da Saúde estavam misturados em preparações. Sendo assim, o grande questionamento desse artigo é baseado na importância da segurança alimentar, alertando a população sobre os riscos, cuidados e prevenção na ingestão de alimentos dentro e fora de casa.

Esse estudo pode ajudar futuros pesquisadores, para levantamento de dados

mais recentes, levando em consideração que o estudo aborda desde o ano de 1999 até agosto de 2019. Pode ser também um forte material de estudo e conscientização para a população, tendo em vista o fato de que o Botulismo não é muito divulgado.

O objetivo desse estudo é mostrar o número de casos registrados e confirmados, o número de óbitos, e os alimentos que foram registrados como contaminados a nível Nacional, separando os resultados por Regiões e Estados. Os dados foram demonstrados através de tabelas e gráficos. Faz-se importante também a reflexão sobre o desmatamento ilegal no Brasil, alertando os perigos e os meios de prevenção para não contribuição deste ato.

O artigo será composto do resumo, abstract, revisão de literatura onde é dividido em 12 tópicos que tratam sobre os tipos de palmitos mais comercializados e consumidos no Brasil, definição do Botulismo, como escolher os produtos na hora da compra, como é feita a salmoura, casos recentes registrados e óbitos no Brasil onde são apresentadas tabelas e gráficos com dados do estudo, tabela de alimentos detectados como contaminados no Brasil. O artigo também será composto pelos métodos, resultados, discussão e referências.

2 | REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Palmitos

No Brasil existem alguns tipos de palmitos, onde o palmito Açaí da família *Euterpe olerácea*, o palmito Juçara da família *Euterpe edulis*, e o palmito Pupunha da família *BactrigascipaeKunth*, são os mais conhecidos e comercializados.

Segundo (Chaimsohn FP et al., 2013) A palmeira Juçara pode fornecer diversos produtos além do palmito: o estipe maduro para caibros e ripas para construção; as folhas são usadas para coberturas temporárias e forrageio; frutos fornecem um “vinho” semelhante ao do açaí *Euterpe oleracea Martius*. Pode – se ver que essa espécie é bem visada, porém, existe uma preservação em questão ao desmatamento ilegal, pois o seu fruto tem sido uma ótima fonte de renda para moradores ribeirinhos e quilombolas. Afinal seu gosto é semelhante ao fruto açaí, podendo então, ser consumido seus frutos sem a necessidade de desmatar a palmeira.

O palmito Pupunha não escurece após o corte, o juçara e açaí escurecem. E devido ao fato de não escurecer ele também é vendido in natura, contudo, pode acontecer o desenvolvimento da bactéria *Clostridium botulinum*, liberando assim, toxinas prejudiciais ao consumidor. Segundo a resolução RDC nº 17, de 19 de novembro de 1999 da ANVISA, a concentração de ácido cítrico deve ser em torno de 0,6 % m/v.

Esse alimento mostra -se muito visado por ser vendido clandestinamente, em fábricas improvisadas nas florestas, onde são higienizados de forma incorreta e embalados sem nenhum tipo de preparo pelos “fabricantes”. Deixando os consumidores

finais em risco de saúde. Esses “fabricantes” também podem falsificar rótulos, o que pode enganar até mesmo estabelecimentos comerciais que não exigem os documentos necessários do fabricante.

O palmito pode carregar o esporo da bactéria *Clostridium botulinum*, que é causadora de uma doença conhecida como botulismo. Sabe-se que esse alimento é muito consumido pelos brasileiros e que ele é usado tanto in natura como em conserva em preparações como tortas, salgados, pastéis.

2.2 Botulismo

Segundo o Ministério da Saúde (2006) o botulismo é uma doença não contagiosa. Apresenta-se sob três formas: botulismo alimentar, botulismo por ferimentos e botulismo intestinal.

O botulismo alimentar pode se manifestar através de uma toxina produzida pelo *Clostridium botulinum*, um bacilo Gram positivo, anaeróbio, esporulado. São conhecidos oito tipos de toxinas botulínicas: A, B, C1, C2, D, E, F e G, das quais as do tipo A, B, E e F são patogênicas para o homem. Os esporos do *C. botulinum* resistem a temperaturas de 120°C por 15 minutos. Estão distribuídos na natureza, no solo, lagos e mares. São encontrados também em legumes, vegetais, mel, vísceras de crustáceos e no intestino de mamíferos e peixes. AnaeroAs condições ideais para que a bactéria assuma a forma vegetativa, produtora de toxina são a anaerobiose, pH alcalino ou próximo do neutro (4,8 a 8,5), atividade de água de 0,95 a 0,97 e temperatura ótima de 37°C. A toxina botulínica é termolábil, sendo inativada pelo calor em uma temperatura de 80°C por, no mínimo, 10 minutos.

A intoxicação pode acontecer pela ingestão de toxinas presentes em alimentos contaminados e que foram produzidos ou conservados de maneira inadequada. Os alimentos mais envolvidos são as conservas vegetais, principalmente as artesanais (palmito, picles, pequi); produtos cárneos cozidos, curados e defumados de forma artesanal (salsicha, presunto, carne frita conservada em gordura – “carne de lata”); pescados defumados, salgados e fermentados; queijos e pasta de queijos e, raramente, em alimentos enlatados industrializados, já que teoricamente todos os procedimentos são feitos adequadamente, desde o corte até a estocagem. Nesse contexto podemos destacar o desmatamento ilegal de palmeiras nas matas, palmitos são colhidos ilegalmente, sem qualquer tipo de higiene, armazenados em lugares sujos e contaminados, sendo vendidos em vidros não esterilizados corretamente, ou em beiras de estradas na forma de assados.

Se o alimento for consumido junto com a toxina, a mesma será protegida do efeito deletério dos ácidos durante a passagem pelo estômago. O intestino delgado é o local onde acontece a máxima absorção da toxina, depois ela segue para o sistema linfático e posteriormente alcança a corrente sanguínea causando danos. Existem

dois grupos diferentes de *Clostridium botulinum* que são os proteolíticos e os não proteolíticos. As cepas proteolíticas produzem uma pró-toxina que sofrerá ação de proteases do próprio microorganismo ainda no alimento e, nesses casos, a toxina é ingerida na forma ativa.

A incubação acontece quando o mecanismo de transmissão envolvido é a ingestão direta de toxina ou pré-toxina já presente no alimento, isso faz com que o período de incubação seja menor e a doença se manifeste mais rápido. No botulismo alimentar especificamente pode variar de duas horas a dez dias, com média de 12 a 36 horas. Quanto maior a concentração de toxina no alimento ingerido, menor será o período de incubação. Por esse motivo, em alguns casos várias pessoas podem ingerir um mesmo alimento contaminado e o tempo de incubação delas serem diferentes, devido a quantidade de alimento contaminado ingerido.

As manifestações gastrintestinais mais comuns são náuseas, vômitos, diarreia e dor abdominal e podem anteceder ou coincidir com os sintomas neurológicos. Os primeiros sinais e sintomas neurológicos podem ser inespecíficos tais como cefaleia, vertigem e tontura. O quadro neurológico é caracterizado por uma paralisia flácida motora descendente associado ao comprometimento autonômico disseminado, que iniciará na face e irá descendo até os dedos dos pés. A disfunção dos nervos cranianos poderá levar à visão turva, ptose palpebral uni ou bilateral, dificuldade de convergência dos olhos e diplopia decorrente da paralisia da musculatura extrínseca do globo ocular. Os movimentos dos globos oculares podem ficar limitados, podendo haver oftalmoplegia, porém, não há perda da acuidade visual. O sistema nervoso autônomo será comprometido e as pupilas ficarão dilatadas e não foto reagentes. Os sinais e sintomas oculares são seguidos por fraqueza dos músculos responsáveis pela mastigação, deglutição e fala, o que pode levar à disfagia e à disartria. É possível observar também a redução dos movimentos da língua, do palato e da musculatura cervical sendo difícil a sustentação do pescoço.

A evolução da doença causará fraqueza muscular que poderá se propagar de forma descendente para os músculos do tronco e membros, ocasionando dispneia, insuficiência respiratória e tetraplegia flácida. A fraqueza muscular acometerá com mais intensidade os membros superiores do que os membros inferiores. Como a toxina produz bloqueio neuromuscular, os reflexos profundos ou ficarão diminuídos ou acabarão desaparecendo nos membros acometidos.

Devido a disfunção autonômica alguns outros sintomas também podem ser observados, como boca seca, íleo paralítico, hipotensão sem taquicardia e retenção urinária. O quadro clínico do botulismo pode impressionar em um aspecto, pois a consciência e sensibilidade são preservados. O botulismo pode evoluir por uma a duas semanas e estabilizar por mais duas a três semanas, antes de iniciar a fase de recuperação. Esta fase pode ter duração variável pois depende da formação de novas sinapses e restauração da função das mesmas. Nas formas mais graves, o período de recuperação pode durar de seis meses a um ano, embora os maiores progressos

ocorram nos primeiros três meses após o início dos sinais e sintomas.

Um tratamento precoce e eficaz pode resultar em completa recuperação. O risco de óbito diminui de forma considerável quando a assistência médica dos pacientes é prestada em unidades de terapia intensiva. Mortes precoces podem ocorrer quando não reconhecem a gravidade da doença existindo um retardo em iniciar a terapia.

2.3 Analisando o produto no ato da compra

Segundo a (ANVISA, 1999) alguns cuidados devem ser observados na hora de comprar o seu palmito, como:

- O palmito deverá estar em uma embalagem hermética e esteja totalmente fechada. A embalagem poderá ser de vidro ou alumínio e não poderá estar com a tampa estufada.
- As embalagens devem estar com lacre nas tampas (nos casos das embalagens de vidro), com a identificação do fabricante do produto litografada na tampa das embalagens de vidro ou na tampa ou fundo das embalagens metálicas de forma visível.
- O palmito não deve estar rosáceo, pois ele pode estar estragado ou até mesmo contaminado por algum microorganismo. Se estiver escuro (exceto o palmito tipo Pupunha) pode ser uma indicação que esse palmito pode ter ficado por um tempo fora da salmoura, o que nos alerta que o processo de produção pode não ter sido feito corretamente.
- O consumidor tem o direito de solicitar ao estabelecimento o documento que permite a licença ao estabelecimento de comercializar o palmito.
- O consumidor deve observar na embalagem se existe um rótulo por cima de outro, se as datas de validade conferem, se ele tem um número de lote, pois se o palmito que for consumido estiver contaminado, a ANVISA solicitará a retirada de todos os palmitos do mesmo lote das prateleiras dos estabelecimentos. O número de lote é o código atribuído para identificar o lote e que permite a rastreabilidade das seguintes informações: data de fabricação; procedência e características da matéria-prima; características dos ingredientes e aditivos utilizados; condições específicas de produção; qualidade do produto e volume de produção.
- No rótulo deve estar comprovado que o palmito tem registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, conforme legislação específica.
- Nos dados do fabricante no rótulo devem conter no mínimo: nome do fabricante, endereço e o Cadastro Nacional de Pessoa Jurídica - CNPJ;
- **SOBRE AS CONSERVAS EM GERAL:** As fábricas e distribuidoras de conservas, são obrigadas a apresentar registro no IBAMA e, demais exigências legais à produção os estabelecimentos comerciais, supermercados, restaurantes e similares, que utilizam palmito em conserva ou in natura, são obrigadas a apresentar a comprovação legal de procedência do produto, e demais exigências legais à comercialização do produto.

2.4 Salmoura

Segundo (ANDRADE, 2012; CAVALCANTE, 2011). O motivo para a acidificação do palmito em conserva tem o intuito a manutenção do pH (máximo 4,5). A água, sal e ácido cítrico são os ingredientes que devem constituir a conserva do palmito garantindo sua acidez eficaz, devem ser adicionadas nas quantidades corretas, caso contrário, o pH da conserva aumenta, contribuindo com que o meio fique propício para o crescimento de micro-organismos, em especial a bactéria *Clostridium Botulinum*. O que determina a quantidade de ácido utilizado na salmoura é a acidez inicial do palmito, o tempo e a temperatura do processo de pasteurização.

Segundo (RAUPP et al, 2007 somente o tratamento térmico no palmito em conserva danificaria, devido ao tempo exigido para esterilização, as suas propriedades sensoriais, principalmente a textura, e como consequência, haveria perda de qualidade do ponto de vista do consumidor. Portanto, para a conserva de palmito, a segurança do processamento tecnológico leva em conta a aplicação de tratamento térmico mais brando chamado de esterilização comercial associado a uma acidificação do produto que garanta pH abaixo ou igual a 4,5 enquanto permanecer na embalagem de comercialização.

A aparência do produto também contribui para o desejo de compra. Estudos apontam que as toxinas botulínicas não costumam danificar os produtos visivelmente. Sendo assim, as toxinas podem estar presentes em qualquer tipo de embalagem, de vidro ou de metal.

O desmatamento ilegal de palmeiras para a comercialização é cada vez maior, o que facilita também a venda ilegal.

A (ANVISA, 1999) determina que restaurantes, supermercados e lanchonetes que fazem o uso de palmitos em conserva obrigatoriamente precisam ter uma licença e a documentação que prove a procedência do mesmo. Sabe – se que o comércio ilegal é fácil, gera mais lucro e existe a concepção de que “ninguém vai ver, ninguém vai saber”. Constantemente observa – se em noticiários o fechamento de fábricas ilegais em meio as florestas. Vale salientar que o comércio ilegal existe porque infelizmente existem compradores, que tem a concepção de que ele comprará o produto e que ninguém saberá. Não existe uma preocupação com as pessoas que vão consumir o produto. Por esses e outros fatores pode -se notar a importância da presença de uma pessoa capacitada para ser responsável pelo local, sendo assim, a ANVISA também determina que fabricantes de palmitos em conserva precisam ser capacitados para tais fins.

Em 2018 a ANVISA publicou na própria página a proibição da fabricação de uma indústria de palmitos em conserva pelo fato de a empresa fabricante não estar licenciada pela autoridade sanitária local competente. Todos os lotes do produto foram proibidos em todo Brasil. O endereço da empresa além de não ter sido localizado no cadastro na Receita Federal do Brasil ele também não foi declarado na rotulagem

do produto, e a empresa ainda, não estava licenciada pela autoridade sanitária local competente.

Segundo a (Anvisa, 1999) a salmoura pode ser adicionada fria ou quente dentro das embalagens até a cobertura total dos palmitos, deixando um espaço livre entre a salmoura e a tampa do vidro. As embalagens são tampadas sem apertar e levadas ao processo de exaustão. A exaustão pode ser feita através de banho maria, túnel de exaustão ou recravadeira a vácuo. Após esse procedimento as embalagens devem ser muito bem fechadas e levadas imediatamente para a esterilização, onde os vidros serão imersos em água fervente, o tempo depende do tamanho do palmito, podendo variar de 25 a 60 minutos. Após a esterilização os vidros devem sofrer imediatamente o resfriamento evitando assim a condensação de vapores ácidos internamente nas tampas. Em seguida no período de estocagem os vidros passam por um período de observação de 15 dias em temperatura ambiente, com o intuito de analisar defeitos da embalagem e eficiência no tratamento térmico, neste período é coletada uma amostra para análise microbiológica da bactéria *Clostridium botulinum*, que pode se desenvolver em temperatura ambiente.

O produto é rotulado e armazenado em caixas de papelão, com a necessidade de permanecer em local escuro, seco, limpo e com boa ventilação.

Como pode-se ver a fabricação da salmoura não é algo tão simples, e requer vários processos, além de cuidados com tempo, quantidade e temperatura. A salmoura feita clandestinamente provavelmente apresenta níveis inferiores de produção, o que possibilita aos esporos da bactéria a contaminação.

2.5 Casos recentes no Brasil

Segundo o banco de dados do Ministério da Saúde e o e-SIC (Sistema eletrônico do serviço de informação ao cidadão) foram registrados alguns casos confirmados de botulismo a nível nacional, do ano de 1999 até 2019, no ano de 1999 foi apontado o primeiro caso de botulismo no Brasil. E os dados presentes na tabela do ano de 2019 correspondem até a data atual.

Abaixo segue a tabela fornecida pelos órgãos mencionados a cima:

Casos confirmados de Botulismo. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1999 a 2019*

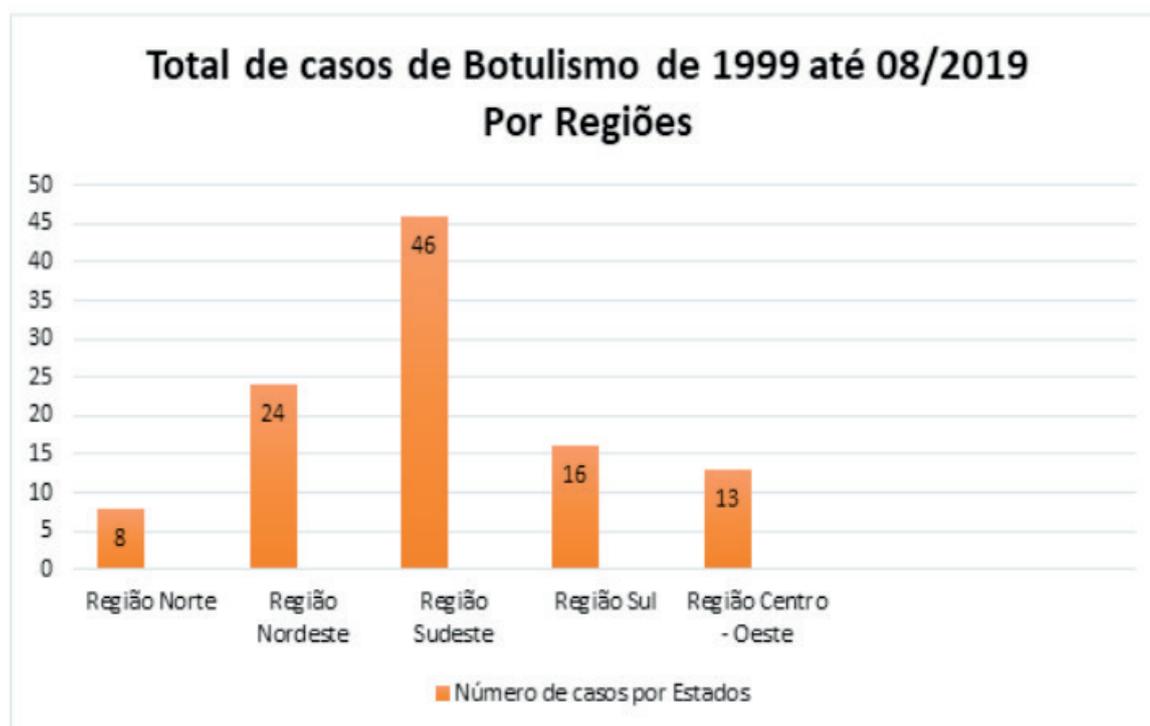
Região/UF	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014*	2015	2016	2017	2018	2019
Região Norte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	5
Rorônia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
Acre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Amazonas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Roraima	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pará	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Maranhão	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Piauí	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ceará	0	0	0	1	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Rio Grande do Norte	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Paraíba	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pernambuco	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
Alagoas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sergipe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bahia	0	0	0	0	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Região Sudeste	1	0	1	2	0	0	6	1	6	5	5	0	1	5	2	3	0	2	2	4	0
Minas Gerais	0	0	0	1	0	0	2	0	1	2	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0
Espírito Santo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rio de Janeiro	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
São Paulo	1	0	1	1	0	0	4	1	5	3	4	0	0	5	0	3	0	0	2	3	0
Região Sul	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	7	4	0	1	0	0	1	0	0
Paraná	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	4	0	1	0	0	1	0	0
Santa Catarina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rio Grande do Sul	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Região Centro-Oeste	0	0	4	4	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2	0	0	0	1	0
Mato Grosso do Sul	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
Mato Grosso	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Goiás	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Distrito Federal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Brasil	1	0	5	7	2	5	8	5	6	6	14	1	8	9	2	6	0	5	5	7	5

Tabela 1 – Casos confirmados de Botulismo. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1999 a 2019

FONTE: Ministério da Saúde, 2019.

Ao analisar essa tabela, observa-se que no geral em todas as Regiões do Brasil do ano de 2015 até 08/2019 os casos de botulismo diminuíram, talvez por uma maior conscientização. Porém nos anos anteriores observa-se um número alto de casos, talvez pela falta de divulgação sobre a doença e seus meios de prevenção.

2.6 Gráfico do total de casos registrados por Região



Analisando o número de casos por Regiões em todo o Brasil nota-se que a Região Sudeste destaca - se pelo número de afetados pelo Botulismo. O que nos mostra que essa Região se destaca pelo grande número de afetados no Estado de São Paulo sugerindo que pessoas desse estado estariam mais propensas a contaminação pelo esporo da bactéria *Clostridium botulinum*. Esse dado sugere que possivelmente pessoas deste Estado estão em maior contato com alimentos enlatados, alimentos não higienizados corretamente, ou até mesmo alimentos adquiridos ilegalmente.

Segundo o Ministério de Saúde, o botulismo não é uma doença tão comum, sendo assim, apenas 1 caso confirmado depois de ser investigado, é o suficiente para ser considerado um surto.

Os cuidados com o tipo de alimento e com a forma de alimentar-se é fundamental. Pois muitas pessoas pensam que a doença nunca poderá acomete-las. Analisando os dados percebemos que essa doença afeta todas as regiões do Brasil, sendo assim, qualquer pessoa em qualquer parte do Brasil pode ser contaminada.

2.7 Casos de óbito por Botulismo no Brasil

Segundo o banco de dados do Ministério da Saúde e o e-SIC (Sistema eletrônico do serviço de informação ao cidadão) foram registrados os casos de óbitos por Botulismo a nível nacional do ano de 1999 até 08/2019.

Abaixo segue a tabela fornecida pelos órgãos mencionados a cima:

Região/ UF	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Região Norte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rorondônia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Amazonas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Roraima	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pará	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Amapá	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tocantins	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Região Nordeste	0	0	0	0	1	4	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Maranhão	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Piauí	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ceará	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rio Grande do Norte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Paraíba	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pernambuco	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Alagoas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sergipe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Piauí	0	0	0	0	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Região Sudeste	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	2	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0
Minas Gerais	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
Espírito Santo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rio de Janeiro	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
São Paulo	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	2	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
Região Sul	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	1	0	0	0	0	0
Paraná	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	1	0	0	0	0	0
Santa Catarina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Rio Grande do Sul	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Região Centro-Oeste	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0
Mato Grosso do Sul	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
Mato Grosso	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Goiás	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Distrito Federal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Brasil	0	0	0	0	1	4	2	2	2	2	3	0	3	2	1	2	0	1	1	0	0

Tabela 2- Óbitos por Botulismo. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1999 a 2019

FONTE: Ministério da Saúde, 2019.

2.8 Gráfico do número de óbitos por Região do Brasil

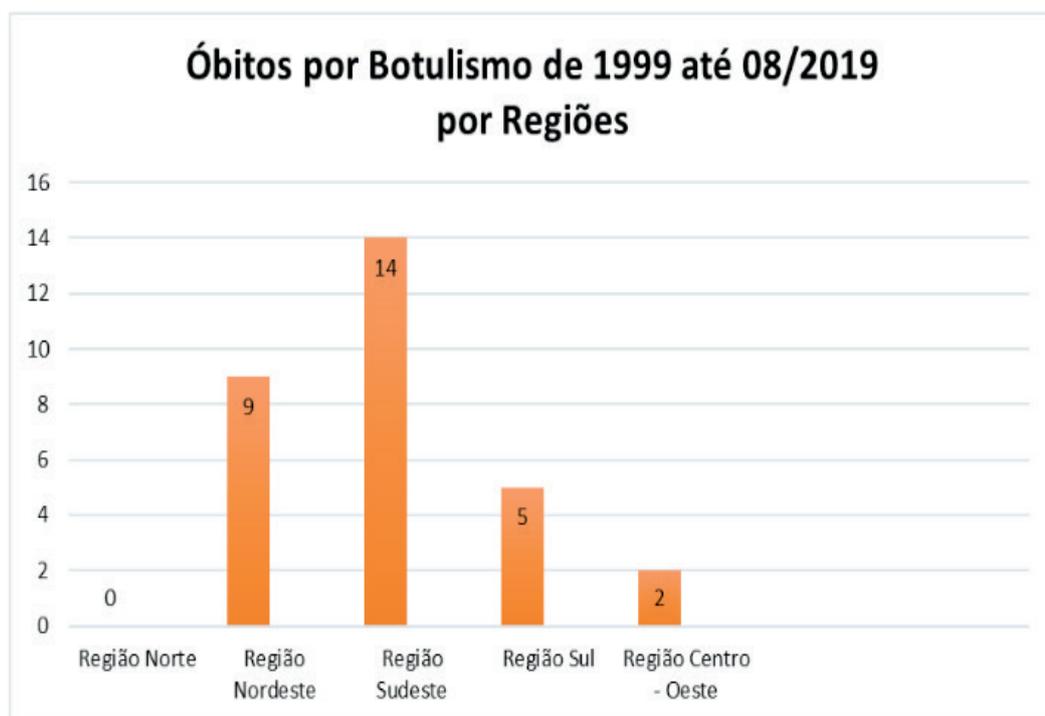


Gráfico do número de óbitos por Região do Brasil

FONTE: Autor

Nesse gráfico observa-se que a região que não obteve nenhum óbito decorrente do Botulismo foi a Região Norte do Brasil. Já a região que mais obteve óbitos decorrente do Botulismo foi a Região Sudeste.

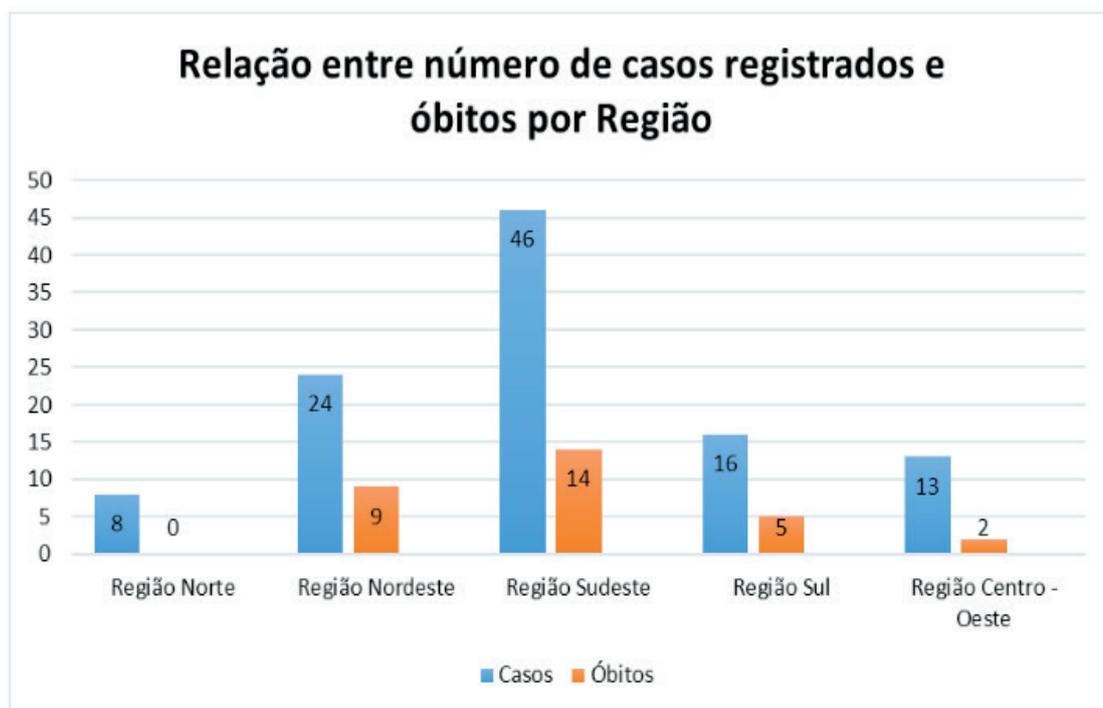


Gráfico de comparação de casos registrados por Região e óbitos por Região

FONTE: Autor

Nesse gráfico observa-se que a Região Norte é a que menos apresenta número de casos registrados e também o menor número de óbitos, a Região Sudeste é a que mais apresenta casos registrados e também a que apresenta o maior número de óbitos.

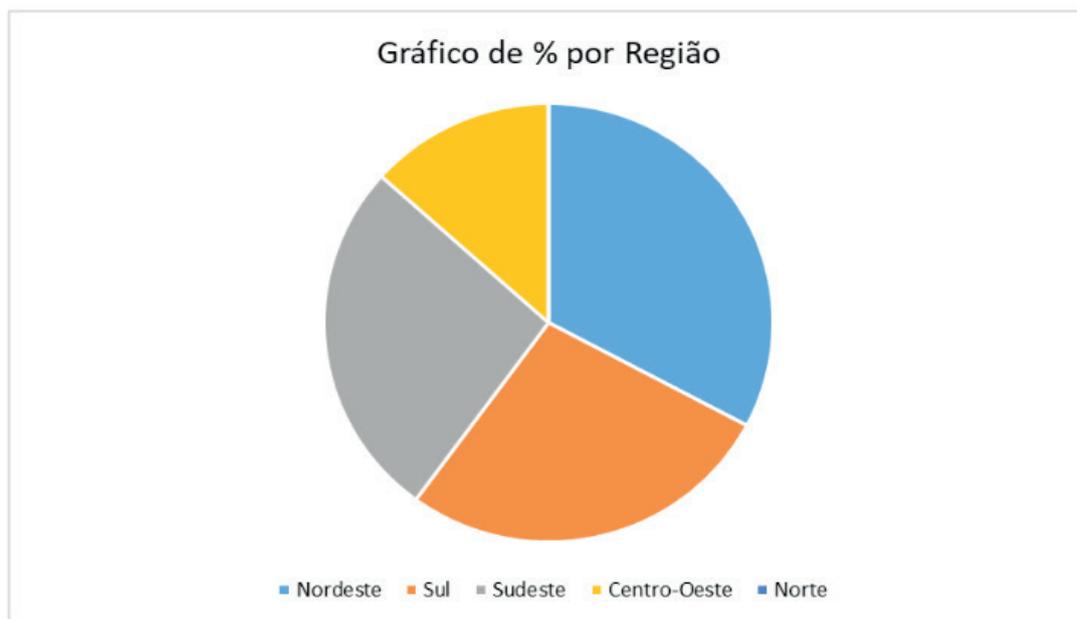


Gráfico de porcentagem de óbitos por Regiões associados aos casos registrados

FONTE: Autor

Ao se analisar os gráficos observa-se que em 1º lugar está a Região Nordeste com 37,5% de óbitos em relação ao número de casos. Em 2º lugar está a Região Sul com 31,25% de óbitos em relação ao número de casos. Em 3º lugar está a Região Sudeste com 30,4% de óbitos em relação ao número de casos. Em 4º lugar está a Região Centro-Oeste com 15,3% de óbitos em relação ao número de casos. E 5º lugar está a Região Norte com 0% de óbitos em relação ao número de casos.

Portanto, apesar da Região Sudeste mostrar-se mais presente no número de casos e de óbitos a Região do Nordeste mostra-se mais deficiente para a cura e salvação da vida dos contaminados pelo Botulismo.

2.9 Alimentos contaminados e relacionados aos casos confirmados de Botulismo no Brasil

2016	2017	2018
ALIMENTOS	ALIMENTOS	ALIMENTOS
Conservante de pimenta	Azeitona em conserva	Atum/Milho/Ervilha
Conserva	Carne	Carne de lata
Enlatado	Embutidos	Coxinha de galinha
Esfirra com palmito	Enlatado	Doce caseiro
Ignorado	Linguiça	Empadão de frango
Industrializado	Palmito/Pimenta	Embutidos
Lanche de frango	Palmito/Carne/Saladas	Estrogonofe
Linguiça/maionese	Pastel/Milho verde	Hot dog
Mortadela	Pão com proteína de soja	Ignorado
Ovo em conserva	Peixe cru	Maionese/Seleta
Palmito/Mel/Linguiça/Pepino	Peixe cru e hambúrguer	Mel
Presunto/Palmito/Azeitona	Presunto	Mel artesanal
Queijo	Sardinha em lata	Mel e própolis
Salsicha	Vários	Mel/Palmito/Morcilha
Salsicha enlatada		Palmito
Salgados		Pêssego em lata
Sanduíche natural; Palmito		Queijo do reino
Sushi		Queijo tofu em conserva
Torta de frango com milho		Salsicha
		Sopa <u>Cr. leite</u> com alho <u>poró</u>
		Torta de frango

Tabela 3- Alimentos contaminados pelo *Clostridium botulinum* do ano de 2016 até 2018.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), esses alimentos foram registrados como contaminados pelo *Clostridium botulinum* em casos registrados nos anos de 2016, 2017 e 2018.

Alguns alimentos não puderam ser identificados, porém, houve a confirmação da contaminação do paciente.

Os alimentos mais frequentes contaminados são os enlatados, embutidos e conservas. Esses são alimentos de fácil acesso, que em dias atuais estão muito presentes no cardápio dos brasileiros, pois, seu preparo é mais rápido e fácil. O fato de fazer as refeições fora de casa, em bares, restaurantes, lanchonetes entre outros, colocam o consumidor em risco por não saber qual a procedência dos alimentos servidos. Infelizmente, sabe-se que os dias dos brasileiros são bem agitados, em muitos casos não podendo evitar o consumo de alimentos nas ruas, sendo assim, o melhor meio para evitar o contágio por bactérias é prevenir, observando os alimentos, o estabelecimento e sua forma de cocção. Prefira alimentos cozidos. Exija explicações e documentos.

Também é visível que muitos alimentos são encontrados em recheios de

preparações que são produzidas em estabelecimentos ou até mesmo em casa, sendo assim, é de extrema importância a preparação correta de todos os alimentos utilizados na hora de cozinhar.

3 | MÉTODOS

O método utilizado foi o de pesquisa quantitativa com a finalidade de analisar os números de casos e óbitos pela contaminação da bactéria *Clostridium botulinum* causadora do botulismo, partindo de uma revisão bibliográfica composta por monografias, publicações em revistas e trabalhos de conclusão de cursos, e órgão da saúde. Também foi composta por análise de tabelas fornecidas por órgãos da saúde. Com intuito de mostrar e alertar a população dos riscos decorrentes de uma alimentação não consciente.

Para isso, a pesquisa será baseada em estudos de autores, análise de tabelas e consequentemente de gráficos.

Foram selecionados e utilizados para as pesquisas 9 artigos científicos de diferentes Estados do Brasil e diferentes autores, sendo que as publicações utilizadas foram de monografias, revistas, jornais e artigos periódicos. Os artigos utilizados começam a partir do ano de 1999 e seguem até o ano de 2016, dois artigos foram atualizados no ano de 2016.

Todos os artigos foram escolhidos por estarem relacionados ao assunto do trabalho que aborda alimentação, botulismo, palmitos, enlatados, conservas e salmoura.

Partindo dos conceitos apresentados pelos autores e dados obtidos através de gráficos, o trabalho analisará as Regiões a nível nacional que apresentam maiores e menores casos registrados de Botulismo e a Região que apresenta o maior e menor número de óbitos, relacionando o tipo de alimento que tem maior registro de contaminação, alertando a população da importância de pensar em uma alimentação melhor e despertar a curiosidade dos mesmos para conhecer a procedência do alimento que irá ingerir.

Sendo assim, os gráficos serão feitos baseados em tabelas e informações concedidas pelo Ministério da Saúde e artigos científicos.

Como parte do processo de construção será necessário o levantamento e análise dos respectivos gráficos para obtenção dos resultados finais.

4 | RESULTADOS

Foram analisados o número de casos registrados e óbitos por Região, por Estado a nível Nacional.

Os resultados encontrados no presente estudo sugerem que o número de casos confirmados de botulismo do ano de 1999 até 2019 a nível nacional está em um nível mediano, ou seja, ele não diminuiu e nem aumentou, nos anos de 2016 até 2019

particularmente pode -se observar que o número de casos confirmados são 5 em cada ano, exceto no ano de 2018 que temos 7 casos confirmados. Através desses dados pode-se notar que não houve uma diminuição de casos o que sugere que talvez precise ser aplicadas ações de conscientização pelos órgãos públicos.

Os números de óbitos por botulismo a nível nacional oscilam, no primeiro período (1999 até 2002) com nenhuma morte registrada, depois (2003 até 2015) as mortes aumentam gradativamente, tem uma queda e finalmente desaparecem.

Os alimentos enlatados, embutidos e conservas demonstram ser os mais contaminados nos anos de 2016 até 2018.

Pode-se notar que os números de casos confirmados continuam aumentando ou estão estacados, o que sugere que nos dias atuais as pessoas costumam consumir mais alimentos de procedência não conhecida ou não preparados corretamente. Porém o número de óbitos diminuiu o que sugere uma preocupação das pessoas em procurar assistência em postos de saúde e hospitais com o surgimento dos sintomas do botulismo.

Sendo assim, prevenir ainda é o melhor meio de evitar o contágio e ajudar na diminuição do número de casos de botulismo.

5 | DISCUSSÃO

Os resultados foram obtidos por análise de dados fornecidos por órgãos competentes e autorizados, com o intuito de mostrar como a contaminação por alimentos através da bactéria *Clostridium botulinum* é constante.

Através de gráficos e tabelas foram feitas possíveis análises sobre as regiões e Estados com maior e menor incidência de casos confirmados e seus respectivos óbitos, onde também foram associados alguns alimentos confirmados como contaminados. Percebe-se que o botulismo está presente em todas as Regiões do Brasil (Norte, Nordeste, Sudeste, Sul, Centro-Oeste). Na região Norte não houve nenhuma morte, ainda que em Rondônia foram confirmados 5 casos. A Região Sudeste foi a que apresentou o maior número de mortes, 14, sendo em São Paulo a maior concentração de casos registrados (33) e mortes (10). Porém, percentualmente analisando, em relação ao número de casos e mortes, a Região Nordeste apresenta um número relevante, pois, o Estado da Bahia apresentou 5 casos registrados e 4 mortes.

E a Região Norte continua sendo a que se apresenta em melhor condição, ela confirma casos de botulismo e não apresenta nenhuma morte, mesmo que em Rondônia sejam registrados 8 casos.

Esses dados podem contribuir com a literatura como um fim informativo para a população, pesquisadores e também a órgão de saúde pública. Alertando a importância do consumo de alimentos de procedência conhecida e também a importância do preparo dos seus próprios alimentos, onde a pessoa pode ter o controle do que está ingerindo, da qualidade, da aparência, desde o momento da escolha dos ingredientes

até o preparo final.

6 | CONCLUSÃO

Mesmo em dias atuais onde a mídia toma conta da população e as pessoas estão suscetíveis a informações diversas nos deparamos com informações incompletas sobre assuntos pertinentes, como é o caso de assuntos relacionados a contaminação por alimentos. Ouve-se falar que inúmeras complicações acontecem, como disenterias, cólicas, vômito, náuseas entre outros, mas não falam sobre bactérias que afetam o sistema nervoso causando danos permanente e até a morte.

O número de casos registrados e óbitos oscilam, mostrando que o número de óbitos registrados desde a primeira vez no Brasil até o ano de 2019 oscilou e finalmente diminuiu, já os números de casos registrados nas mesmas condições permanecem médios, não diminuiu e nem aumentou, o que sugere que as pessoas estão sendo contaminadas sempre e que possivelmente faltam ações de conscientização para alertar a prevenção do botulismo.

7 | AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, professora e mestre Ana Luiza do Rosário Palma, que me orientou nesse artigo e no meu primeiro projeto da vida que foi um congresso com um tema semelhante, com certeza eu nunca esqueci quem foi a pessoa que me inspirou a seguir nessa jornada que estou iniciando de congressos e publicações. Em seguida agradeço a minha professora, mestre e coordenadora do curso de Nutrição, Maria Juciara de Abreu Reis que sempre me apoiou em todos os trabalhos que eu quis fazer ao mesmo tempo e sempre acreditou em mim, me acompanhando presencialmente em minhas apresentações.

Agradeço ao meu marido, Miguel por entender as muitas horas que fiquei em frente ao computador, e por me ajudar quando precisei.

Agradeço com toda certeza aos meu colegas e familiares que colaboraram para a publicação desse trabalho comprando a rifa que eu vendi.

Por último e mais importante para mim, agradeço a minha avó Maria Jacyra de Oliveira Reis, que me proporciona o sonho da graduação e sempre se preocupou comigo e com meus estudos.

Que Krishna abençoe todos nós!

REFERÊNCIAS

Andrade TF. **Importância das análises físico – químicas no controle de qualidade de alimentos consumidos em Santa Catarina.** [citado 2012 jan] Florianópolis; 2012. Disponível em: http://spb.ufsc.br/files/2012/09/MONOGRAFIA_TIFFANY-FLORIANO-DE-ANDRADE.pdf

Cavalcanti ACL, Anjos JFL, Castro LMP, Santos RN. **Guia de gerenciamento de risco para palmito**

em conserva [acesso online]. Maranhão: Monografia apresentada para obtenção do título de especialização em vigilância sanitária disciplina: alimentos da Universidade Federal do Maranhão; 2011.

http://www.ensp.fiocruz.br/portal-ensp/_uploads/documentos-pessoais/documento-pessoal_39079.pdf

Cruz DA. **Análise Físico-química do palmito de açaí (euterpe oleácea) na forma in natura no município de Buritis.** [citado 2015 jun. 16]. Rondônia;2015. Disponível em: <http://repositorio.faema.edu.br:8000/bitstream/123456789/658/1/CRUZ%2C%20D.%20A.%20-%20AN%C3%81LISE%20F%C3%8DSICO-QU%C3%8DMICA%20DO%20PALMITO%20DE%20A%C3%87A%C3%8D%20%28euterpe%20ole%C3%A1cea%29%20NA%20FORMA%20IN%20NATURA%20NO%20MUNIC%C3%8DPPIO%20DE%20BURITIS-RO.pdf>

Chaimsohn FP. Chiquetto CN. **Construção do marco legal para a produção de açaí de Juçara: contribuições da “oficina interestadual sobre legislação, comercialização e marketing para exploração de frutos da palmeira Juçara”** Revista Conexão UEPG. 2013 jun/dez; Capa - volume 9 número2

<https://www.revistas2.uepg.br/index.php/conexao/article/view/5416/3663>

Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília; 2006 [acesso 27 jun 2019]. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_epidemiologica_botulismo.pdf

Raupp DS. Kulchetski L. Bosmuler LC. **Processamento de palmito Jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) em conserva. Revista Tecnológica.** 2007; 16: 75 - 82; 2007.

<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/RevTecnol/article/view/5025>

Ministério da Saúde - MS Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Manual do botulismo (Versão 1.1)** [Internet]. Brasília (DF): dez/2006 [última atualização 07/03/2016]. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=313725&_101_type=document&redirect=http%3A%2F%2Fportal.anvisa.gov.br%2Fresultado-de-busca%3Fp_p_id%3D3%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dnormal%26p_p_mode%3Dview%26p_p_col_id%3Dcolumn-1%26p_p_col_count%3D1%26_3_groupId%3D0%26_3_keywords%3Dbotulismo%26_3_cur%3D1%26_3_struts_action%3D%252Fsearch%252Fsearch%26_3_format%3D%26_3_formDate%3D1441824476958

Ministério da Saúde - MS Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 17 de 19/11/1999 - Padrão de Identidade e Qualidade para PALMITO EM CONSERVA** [Internet]: 19 nov /1999 [última atualização 27/06/2016]. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_17_1999_COMP.pdf/4ecc1852-a924-4668-ac61-d64df55e4fc4

Raupp DS. Kulchetski L. Bosmuler LC. **Processamento de palmito Jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) em conserva. Revista Tecnológica.** 2007; 16: 75 - 82; 2007.

<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/RevTecnol/article/view/5025>

CONTROLE BIOLÓGICO DE INSETOS- PRAGAS POR *BACULOVÍRUS*

Data da submissão: 19/11/2019

Data de aceite: 10/12/2019

Lyssa Martins de Souza

Universidade Federal Rural da Amazônia,
Programa de Pós-Graduação em Agronomia,
Paragominas - Pará.

<http://lattes.cnpq.br/1497487024465326>

Shirlene Cristina Brito da Silva

Universidade Federal Rural da Amazônia,
Programa de Pós-Graduação em Agronomia,
Paragominas - Pará.

<http://lattes.cnpq.br/7059701574234901>

Artur Vinícius Ferreira dos Santos

Universidade Federal Rural da Amazônia,
Programa de Pós-Graduação em Agronomia,
Tomé-Açu - Pará.

<http://lattes.cnpq.br/7136004873949490>

Débora Oliveira Gomes

Universidade Federal Rural da Amazônia,
Programa de Pós-Graduação em Agronomia,
Belém - Pará.

<http://lattes.cnpq.br/6463203819351593>

Josiane Pacheco de Alfaia

Universidade Federal Rural da Amazônia,
Programa de Pós-Graduação em Agronomia,
Belém - Pará.

<http://lattes.cnpq.br/5286442594691074>

Raiana Rocha Pereira

Universidade Federal Rural da Amazônia,
Programa de Pós-Graduação em Agronomia,
Belém - Pará.

<http://lattes.cnpq.br/3139130006625777>

Raphael Coelho Pinho

Universidade Federal Rural da Amazônia,
Programa de Pós-Graduação em Agronomia,
Marabá - Pará.

<http://lattes.cnpq.br/2048871020709747>

Telma Fátima Vieira Batista

Universidade Federal Rural da Amazônia,
Programa de Pós-Graduação em Agronomia,
Belém-Pará.

<http://lattes.cnpq.br/8251281115341075>

RESUMO: O controle biológico é um método racional e saudável de combate as pragas agrícolas, no qual, utiliza-se inimigos naturais, insetos (predadores e/ou parasitóides) e micro-organismos (bactérias, fungos e vírus), que sejam benéficos a produção agrícola. Em busca de formas alternativas de minimizar o uso de inseticidas químicos no meio agrícola, o *Baculovírus* é considerado o agente de controle biológico que não mata os inimigos naturais das pragas no cultivo, não deixa resíduos nos alimentos a serem comercializados e são inofensivos ao meio ambiente e à saúde da população. O objetivo deste trabalho foi abordar os principais aspectos do controle biológico pelo *Baculovírus* em lagartas presentes nas produções agrícolas. Concluímos que o *Baculovírus* é eficiente e específico contra

o ataque de lagartas no meio agrícola e, principalmente, não deixando resíduos no produto final e não contaminando o meio ambiente.

PALAVRAS-CHAVE: controle biológico, *Baculovirus*, lagarta, produção agrícola.

BIOLOGICAL CONTROL OF INSECT PESTS FOR *BACULOVIRUS*

ABSTRACT: Biological control is a rational and healthy method of combating agricultural pests in which natural enemies, insects (predators and/or parasitoids) and microorganisms (bacteria, fungi and virus) are beneficial to Agricultural production. In search of alternative ways to minimize the use of chemical insecticides in the agricultural environment, Baculovirus is considered the biological control agent that does not kill the natural enemies of pests in the crop, leaves no residues in food to be marketed and is harmless to the environment. and the health of the population. The objective of this work was to address the main aspects of Baculovirus biological control in caterpillars present in agricultural production. We conclude that Baculovirus is efficient and specific against the attack of caterpillars in the agricultural environment and, mainly, leaving no residues in the final product and not contaminating the environment.

KEYWORDS: biological control, Baculovirus, caterpillars, agricultural production.

1 | INTRODUÇÃO

O controle biológico vem ganhando destaque em programas de manejo integrado de pragas (MIP), principalmente em um momento que se discute muito a produção integrada rumo a uma agricultura sustentável (PARRA et al., 2002).

O controle biológico é um método de controle racional e saudável de combate as pragas agrícolas, no qual, utiliza-se inimigos naturais que podem ser outras ordens de insetos benéficos (predadores e/ou parasitóides) e/ou micro-organismos como fungos, vírus e bactérias, que não deixam resíduos nos alimentos e são inofensivos ao meio ambiente e à saúde da população (EMBRAPA, 2019).

O controle biológico é importante como medida de controle para manutenção de pragas abaixo do nível de dano econômico, junto a outros métodos, como o de resistência de plantas a insetos, que podem até ser integrados com métodos químicos (produtos seletivos) ou mesmo com plantas transgênicas (PARRA et al., 2002). No ano de 2010, o mercado de produtos de controle biológico no Brasil, foi de aproximadamente U\$ 70 milhões. Embora elevada em termos absolutos, a participação percentual ainda é inferior ao mercado de agrotóxicos sintéticos (EMBRAPA, 2019).

As principais vantagens do uso de microrganismos entomopatogênicos para o controle de pragas são a especificidade e a seletividade desses agentes de controle, bem como a facilidade de multiplicação, dispersão e produção em meios artificiais e a ausência de poluição ambiental e toxicidade ao homem e outros organismos não-alvo, entre outras. Dessa forma, percebe-se que o controle microbiano de insetos, como braço do controle biológico, é base de sustentação do equilíbrio natural das espécies

de insetos potencialmente consideradas como pragas (BUENO et al., 2015).

2 | AGENTES ENTOMOPATÓGENICOS NO CONTROLE BIOLÓGICO.

A utilização de entomopatógenos para o controle de pragas é mais uma alternativa eficiente e segura ao uso de agrotóxicos. Apesar de ser uma área do conhecimento relativamente antiga, o controle microbiano tomou grande impulso principalmente após a proibição do uso dos inseticidas organoclorados, e também, em decorrência do Manejo Integrado de Pragas (MIP) como prática racional no controle de insetos prejudiciais em sistemas agrícolas e florestais (MOINO JUNIOR, 2009).

Os principais microrganismos relacionados ao controle microbiano de insetos são fungos, bactérias, vírus e nematoides entomopatogênicos (Tabela 1).

Micro-organismo	Característica
Fungo	<ul style="list-style-type: none">• São Unicelulares ou pluricelulares.• São compostos por um conjunto de células denominado micélio.• O micélio (estruturas vegetativas) são denominadas hifas.• Penetração via tegumento.
Bactéria	<ul style="list-style-type: none">• São unicelulares e procariontes.• Geralmente, em forma de bastonetes.• Penetram no inseto por via oral.
Nematoide	<ul style="list-style-type: none">• São vermes que não possuem estiletes ao redor da boca.• Carregam em seu interior um pequeno inóculo de bactérias específicas.• As bactérias são liberadas no interior do corpo do inseto após a penetração.• Penetram via aberturas naturais (boca, ânus).
Vírus	<ul style="list-style-type: none">• São macromoléculas (nucleoproteínas).• Possuem somente um tipo de ácido nucleico (DNA ou RNA).• São parasitos celulares obrigatórios.• Penetram nos insetos por via oral.

Tabela 1 - Micro-organismos utilizados no controle biológico de pragas. Adaptado de BUENO et al. (2015)

3 | VÍRUS ENTOMOPATOGÊNICO

Os vírus são macromoléculas, frequentemente nucleoproteínas, dotadas ou não de membrana envoltória, capaz de replicar quando introduzidas em célula permissíveis, isto é, nas quais o vírus tem condição de se multiplicar (RIBEIRO et al., 1998).

Os vírus apresentam algumas características marcantes, como apenas um tipo de ácido nucleico, tem composição química simples, não contém informações que geram energia, tem dimensões sub-microscópicas, replicam-se por processo de montagem e não de crescimento ou divisão, e são parasitas celulares obrigatórios (RIBEIRO et al., 1998).

Os vírus são considerados patógenos de ação lenta, sendo essa uma grande desvantagem comercial. A especificidade hospedeira que apresentam, apesar de ser um ótimo indicativo no aspecto de segurança, é o principal fator limitante na produção, pois o fato de serem patógenos obrigatórios exige que sua produção seja feita sobre o hospedeiro original, o que prejudica o desenvolvimento de processos de produção mais eficientes (produção *in vitro*) (BUENO et al., 2015).

Segundo o relatório publicado em 1995 pela ICTV – International Committee of Virus Taxonomy, a Tabela 2 são os vírus que infetam insetos (RIBEIRO et al., 1998).

Ácido nucleico	Família
dsDNA	Poxiviridae Iridoviridae Baculoviridae Polydnaviridae
ssDNA	Parvoviridae
dsRNA	Reoviridae Birnaviridae
ssRNA sentido negativo	Rhabdoviridae Bunyaviridae
ssRNA	Picornaviridae Caliciviridae Nodaviridae Tetraviridae Flaviviridae Togaviridae

Tabela 2 - Classificação dos vírus que se replicam em insetos. Fonte: adaptado RIBEIRO et al. (1998)

*ds: fita dupla; ss: fita simples

A principal família de vírus de interesse entomológico é Baculoviridae, cujos principais representantes pertencem ao gênero *Baculovirus*. Por serem eficientes, específicos e seguros para o homem e outros animais, estes vírus preenchem todos os requisitos básicos como alternativa aos inseticidas químicos, tóxicos e poluentes, utilizados na proteção de culturas (BERTI FILHO; MACEDO, 2011).

4 | BACULOVÍRUS

Pertencentes à família Baculoviridae, os *Baculovirus* formado por material genético do tipo DNA circular de fita dupla, sendo caracterizados pelos nucleocapsídeos de vírus infeccioso que se encontram dentro de uma matriz protéica (Figura 1).

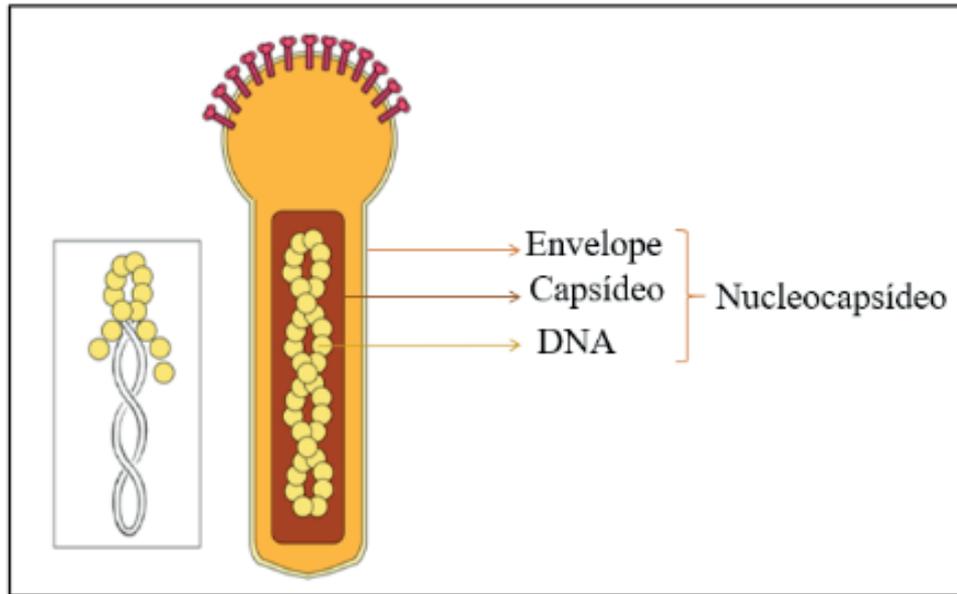


Figura 1 - Estrutura do Baculivírus. Fonte: adaptado de PIDRE et al. (2013).

A família dos *Baculovirus* era dividida em dois gêneros baseada no tamanho das partículas virais e natureza da proteína do corpo de oclusão (PAIVA et al., 2015):

- a) Os nucleopoliedrovírus apresentam forma poliédrica e podem ser do tipo múltiplo (MNPV) ou simples (SNPV), de acordo com o número de capsídeos por vírion;
- b) Os granulovírus (GV) contêm, em geral, partículas únicas, oclusas em corpos protéicos de forma ovóide (Figura 2).

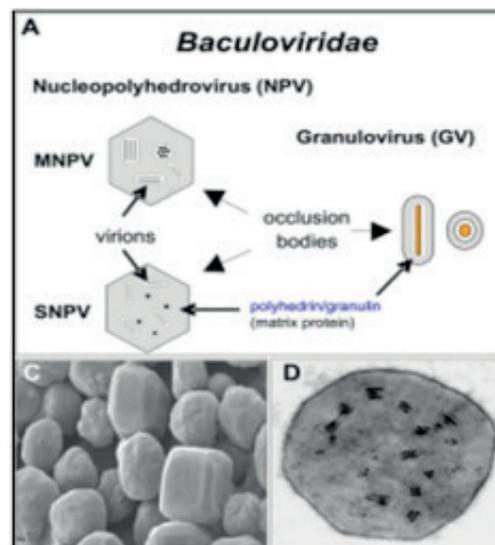


Figura 2 - Classificação da família Baculoviridae em dois gêneros, *Nucleopoliedrovírus* (NPV) e *Granulovírus* (GV). Fonte: HERRMANN (2013).

Após análise do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (International Committee of Virus Taxonomy - ICTV) houve uma nova classificação através de

evidências filogenéticas, e atualmente existem quatro gêneros dentro da família Baculoviridae (PAIVA et al., 2015):

- *Alphabaculovirus*: inclui todos os NPVs de lepidópteros formadores dos fenótipos virais BV (do inglês budded virus) e ODV (do inglês occlusion-derived virus);
- *Betabaculovirus*: compreende os GVs de lepidópteros que também formam partículas virais durante a infecção;
- *Gammabaculovirus*: específico de himenópteros engloba os NPVs que não possuem genes correspondentes às proteínas específicas da partícula BV;
- *Deltabaculovirus*: inclui os *baculovirus* de dípteros que não apresentam em seu genoma um gene homólogo ao que codifica a expressão da poliedrina, característico dos demais NPVs.

5 | IMPORTÂNCIA DO BACULOVÍRUS

Dentre os métodos de controle biológico, destaca-se o uso de produtos à base de vírus, principalmente os *Baculovirus* que têm essa finalidade desde a década de 60, compreendendo o maior grupo de vírus de insetos (ANDRADE; NEGREIRO; FALLEIROS, 2004).

A vantagem em utilizar os *Baculovirus* é por serem específicos em relação ao seu hospedeiro e inofensivos ao ser humano. O caso de maior sucesso mundial no uso de *Baculovirus*, no controle biológico, é contra a lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis*) (Tabela 4), onde os principais danos são causados pela fase larval, pois comem tanto o limbo como as nervuras das folhas, podendo ocasionar 100% de desfolhamento até atingirem o seu desenvolvimento máximo, para tornarem-se pupa (ANDRADE; NEGREIRO; FALLEIROS, 2004).

Vírus	Praga	Cultura
Nucleopoliedrovírus	<i>Anticarsia gemmatilis</i> Hübner Lagarta da soja	Soja
Nucleopoliedrovírus	<i>Spodoptera frugiperda</i> (SfNPV) Lagarta-do-cartucho	Milho
Vírus de granulose	<i>Erinnyis ello</i> Linnaeus Mandarová- da-mandioca	Mandioca

Tabela 4 - Principais Baculovirus utilizados no controle biológico. Adaptado de CASTROS et al. (1999).

6 | CICLO DE INFECÇÃO

A família Baculoviridae é a mais numerosa e estudada de todos os grupos de vírus entomopatogênicos. A transmissão é baseada em duas formas, a forma oclusa do vírus (ODV) e a não oclusa (BV), figura 3, sendo a primeira responsável pela transmissão de inseto para inseto, enquanto a segunda pela infecção sistêmica, ou seja, pela

transmissão de uma célula a outra célula em um mesmo indivíduo (CABALLERO et al., 2009).

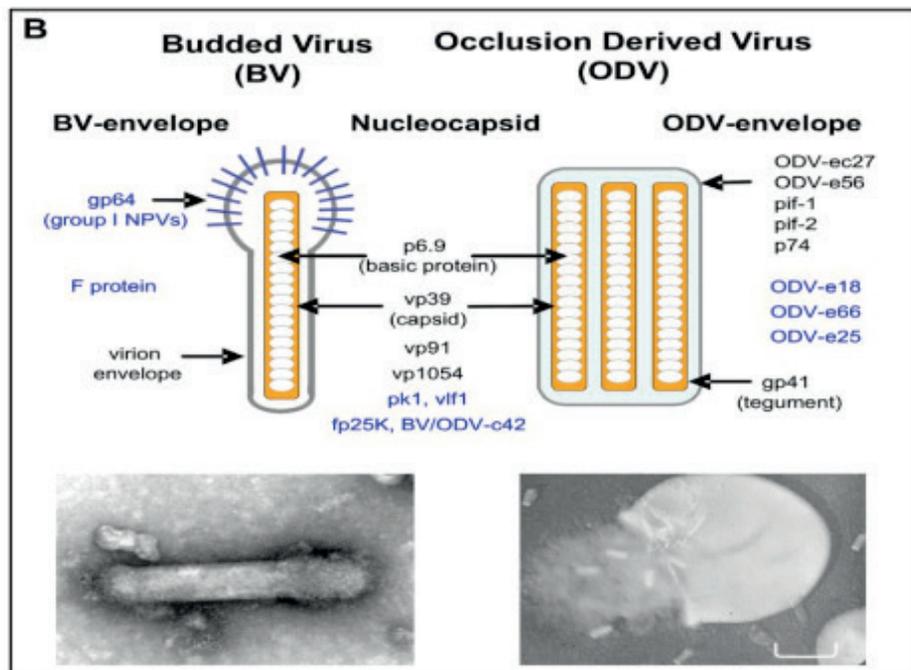


Figura 3 - Estrutura do *Baculovirus*. BV, partículas virais não oclusas; ODV, partículas virais oclusas. Fonte: HERRMANN (2013).

A infecção no inseto ocorre por dois tipos de progênes, a infecção primária e a secundária (ou sistêmica), conforme a Figura 4 (PAIVA et al., 2015).

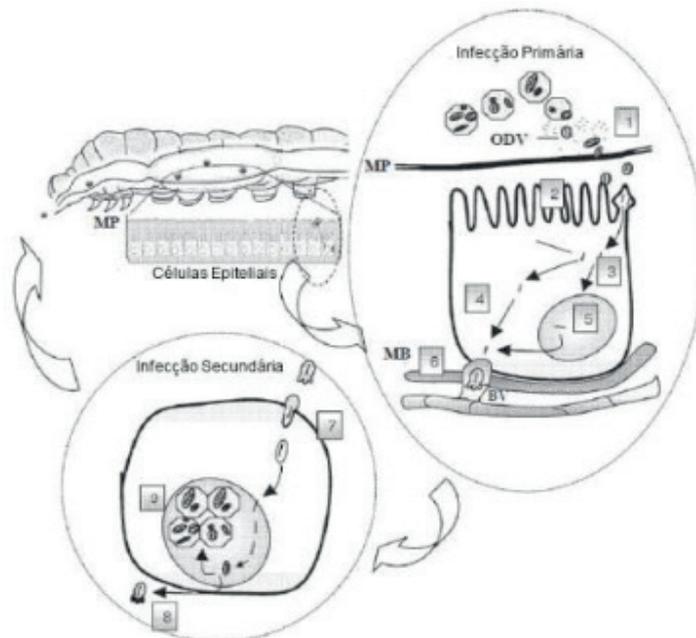


Figura 4 - Ciclo de infecção do *Baculovirus* no inseto. Fonte: PAIVA et al. (2015) adaptado de CABALLERO et al. (2009)

I. O ciclo de infecção do *Baculovirus* é iniciado com a ingestão, pela fase larval de um inseto susceptível, de corpos de oclusão (OB) do vírus presentes na

superfície das folhas;

II. Os OBs ingeridos se solubilizam no mesêntero do inseto susceptível, liberando os vírions derivados da forma oclusa do vírus (ODV);

III. Posteriormente, atravessam a membrana peritrófica (MP) através dos poros naturais;

IV. Em seguida, a membrana do vírion se funde com a membrana das células epiteliais;

V. Os nucleocapsídeos (NC) desprovidos de membrana atravessam o citoplasma dirigindo-se ao núcleo onde ocorre a primeira replicação do DNA viral;

VI. Outros, porém atravessam o citoplasma e chegam a membrana basal, sem passar pelo núcleo;

VII. Em seguida, os nucleocapsídeos atravessam a membrana celular formando os vírions brotados (BVs) e passam para a cavidade hemocélica através das traqueólas;

VIII. Na hemocele, os BVs iniciam o processo infeccioso secundário, infectando as células dos órgãos e tecidos por endocitose;

IX. Os nucleocapsídeos formam novamente BVs favorecendo a dispersão da infecção;

X. Em uma fase mais avançada do processo infeccioso vírions e OBs formados acumulam-se na célula e finalmente ocorre a sua liberação no meio devido a ruptura das respectivas células.

7 | SINTOMAS DA INFECÇÃO

Os sintomas característicos do processo infeccioso por NPV (Vírus da Poliedrose Nuclear) em lagartas susceptíveis incluem: perda de apetite, geotropismo negativo, clareamento da epiderme devido ao acúmulo de vírus nos núcleos das células epiteliais e no tecido adiposo (RIBEIRO *et al.*, 1998).

Esses sintomas característicos aparecem depois do terceiro ou quarto dia, sendo que os primeiros sinais observados são manchas no tegumento da lagarta, o qual adquire uma tonalidade amarelada e aparência oleosa. Em seguida, a lagarta reduz sua mobilidade, parar de se alimentar e sobe até a parte mais alta da planta, ficando pendurada pelas pernas abdominais (Figura 5A) e, depois, devido a desintegração dos tecidos internos, o tegumento adquire uma coloração escura e ou aspecto opaco (branco-leitoso) em relação à lagarta sadia. Após alguns dias, dependendo da espécie hospedeira e do vírus, ocorre o rompimento do corpo do inseto (Figura 5B) liberando grande quantidade de vírus no ambiente (MOSCARDI, 1999; PAIVA *et al.*, 2015).

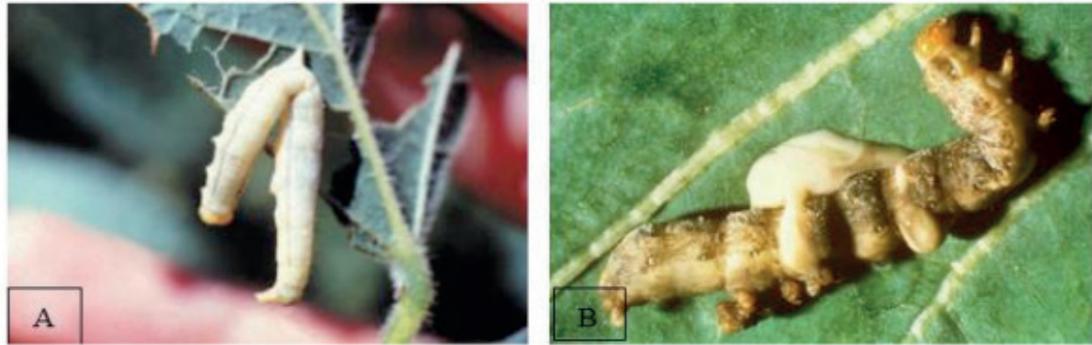


Figura 5: Sintomas característicos do processo infeccioso no inseto A) clareamento do tegumento e geotropismo negativo; B) rompimento do tegumento. Fonte: GRAMKOW (2013).

8 | PRODUÇÃO DE BACULOVIRUS

No sistema de produção de *baculovirus*, a forma mais empregada e utilizada é a produção *in vitro*. Para a multiplicação viral, as lagartas hospedeiras são criadas em laboratório e alimentadas com dieta artificial, sendo posteriormente, maceradas com água e pulverizadas nas plantações. No Brasil, o *Baculovirus anticarsia* é bastante usado no controle da lagarta-da-soja, no qual, utiliza-se lagartas infectadas pelo vírus. Para o preparado do *Baculovirus* recomendando-se de 50 a 70 lagartas infectadas grandes, que são maceradas com cerca de 5 mL de água por hectare. A suspensão, com os poliedros do vírus, passa por uma peneira, sendo em seguida colocada em um pulverizador com 100 a 200 litros de água (Figura 6), visando dar uma cobertura uniforme à área tratada (BERTI FILHO; MACEDO, 2011).

A aplicação do *Baculovirus* deve ser realizada no início do ataque do inseto, nas fases iniciais de desenvolvimento (EMBRAPA, 2010). E para tal aplicação, recomenda-se:

- Aplicar quando encontradas de 5 a 7 lagartas pequenas por planta;
- Descongelar a calda de Baculovirus somente no momento da aplicação;
- Verificar o estado de conservação do pulverizador e dos bicos;
- Dissolver a dose do vírus em água;
- Verificar o pH da calda (ácido);
- Aplicar pela manhã ou fim da tarde.



Figura 6: Preparo do *Baculovirus*. A) Maceração das lagartas coletadas em campo em água; B) Filtração do preparo em pano fino ou gazes; C) Armazenamento da calda de *Baculovirus*.
 Fonte: EMBRAPA (2010).

Diversos fatores que afetam a multiplicação do vírus no interior do hospedeiro são importantes e devem ser estudados para se evitar perdas, tais como temperatura e a idade ideal de inoculação do vírus, possibilidade de utilização de hospedeiros alternativos ou da possibilidade de utilização de um isolado que não provoca o rompimento imediato da lagarta após sua morte reduzindo perdas de poliedros virais durante a coleta das lagartas que precede a formulação do bioinseticida (PAIVA et al., 2015).

Um exemplo disso é no caso do *Baculovirus spodoptera* em que a descoberta de um isolado altamente virulento e que não provoca o rompimento imediato do tegumento larval aumentou a eficiência do processo de produção reduzindo as perdas no processo de fabricação e facilitando o manuseio das larvas mortas pelo vírus (PAIVA et al., 2015).

9 | PRODUTOS COMERCIAIS

No Brasil, existem alguns produtos à base de vírus desenvolvidos por indústrias e centros de pesquisa (Tabela 3).

Inseto-alvo	Produto	Empresa
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	<i>Protege</i>	Geratec (Defensa)
<i>A. gemmatalis</i>	Baculoviron	Tecnivita
<i>A. gemmatalis</i>	<i>Baculovirus</i>	Nitral
<i>A. gemmatalis</i>	Baculo-soja	Nova Era
<i>Erinnyis ello</i>	<i>Baculovirus erinnyis</i>	IAPAR
<i>A. gemmatalis</i>	<i>Baculovirus anticarsia</i>	Embrapa-AEE
<i>A. gemmatalis</i>	<i>Baculovirus anticarsia</i>	EPAGRI
<i>A. gemmatalis</i>	<i>Baculovirus anticarsia</i>	IAPAR
<i>A. gemmatalis</i>	<i>Baculovirus anticarsia</i>	COODETEC
<i>A. gemmatalis</i>	<i>Baculovirus anticarsia</i>	Embrapa/CNPSo

Tabela 3 - Produtos à base de vírus desenvolvidos pelas indústrias e centros de pesquisas . GALLO et al. (2002) apud BERTI FILHO; MACEDO (2011).

Um exemplo de produtos é o BACULO® SOJA é um inseticida biológico registrado pela empresa Novozymes à base de *Baculovirus anticarsia*, específico para o controle da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis*. Sua aplicação deve ser feita para as lagartas ainda pequenas (menores que 1,5 cm) na maioria. A dosagem é de 20 g/ha realizando uma pré-mistura com um pouco de água e agitando vigorosamente. Em seguida adicionar esta suspensão diretamente no pulverizador em agitação. Devendo ser reaplicado em caso de reinfestação, mas observando as limitações de uso e outras restrições (AGROLINK, 2019).

10 I CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção agrícola no mundo sofre perdas significativas devido ao ataque de insetos reduzindo a produção de várias culturas. Buscando algum tipo de controle da população do inseto-praga, o agricultor utiliza inseticidas químicos em doses elevadas. Essa prática, além de causar resistência às pragas ao inseticida, causam danos ao meio ambiente e à saúde humana, exigindo alto investimento financeiro.

Dentre os métodos de controle biológico, destacasse o uso de produtos à base de vírus, principalmente os *Baculovirus* que é um vírus com DNA dupla fita, específicos aos seus hospedeiros, constituem agentes ideais para o controle de pragas, sem riscos aos vertebrados e a outros organismos, e também, não poluindo o meio ambiente.

REFERÊNCIAS

AGROLINK. **Agrolinkfito: Bula Baculo-Soja**. Disponível em < https://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/produto/baculo-soja_7491.html > acessado em 20 de maio de 2019.

ANDRADE, F.G.; NEGREIRO, M.C.C.; FALLEIROS Â.M.F. Aspectos dos mecanismos de defesa da lagarta da soja *Anticarsia Gemmatalis* (hübner, 1818) relacionados ao controle biológico por *Baculovirus anticarsia* (AGMNPV). **Arq. Inst. Biol.**, v.71, n.3, p.391-398, 2004.

BERTI FILHO, E.; MACEDO, L. P. M. **Fundamentos de controle biológico de insetos-praga**. IFRN,

p. 108, 2011.

BUENO, V. H. P.; LINS JR, J. C.; MOINO JR, A.; SILVEIRA, L. C. P. **Controle biológico e manejo de pragas na Agricultura sustentável**. Departamento de Entomologia/UFLA. 2015. Disponível em <[http://www.den.ufla.br/attachments/article/75/ApostilaCB%20\(final\).pdf](http://www.den.ufla.br/attachments/article/75/ApostilaCB%20(final).pdf)> acessado em 07 de maio de 2019.

CABALLERO, P.; MURILLO, R.; MUÑOZ, D.; WILLIAMS, T. El nucleopoliedrovirus de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) como bioplaguicida: análisis de avances recientes en España. **Revista Colombiana de Entomología, Bogotá**, v. 35, n. 2, p. 105-111, 2009.

EMBRAPA. **Controle biológico: ciência a serviço da sustentabilidade**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/tema-controle-biologico/sobre-o-tema>> acessado em 07 de maio de 2019.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, p. 920, 2002.

GRAMKOW, A. W. **Patologia dos baculovírus: Efeito da ação de enzimas heterólogas e análise da resposta transcricional do hospedeiro durante a infecção viral**. 2010. 157 p. Tese (doutorado em Patologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

HERRMANN, J. **Maschinelles Lernen und wissensbasierte Systeme: systematische Einführung mit praxisorientierten Fallstudien**. Springer-Verlag, 2013.

MOINO JUNIOR, A. Produção de agentes entomopatogênicos. In: BUENO, V.H.P. (Ed.). **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2009. 430p. p.277-296.

MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 44, p. 257-289, 1999.

PAIVA, C. E. C.; VALICENTE, F. H.; SANTOS JR, H. J. G. **Controle microbiano de insetos-praga: vírus entomopatogênico**. Universidade Federal do Espírito Santo, 2015.

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORREA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. 2002. Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. Editora Manole, São Paulo. 609p.

PIDRE, M. L.; FERRELLI, M. L.; HAASE, S.; ROMANOWSKI, V. Baculovirus display: a novel tool for vaccination. In: Current Issues in Molecular Virology-Viral Genetics and Biotechnological Applications. **IntechOpen**, 2013.

RIBEIRO, B. M.; SOUZA, M. L.; KITAJIMA, E. W. Taxonomia, caracterização molecular e bioquímica de vírus de insetos. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 481-508.

HIV/AIDS: O QUE EVOLUIU APÓS VINTE E CINCO ANOS?

Data de aceite: 10/12/2019

Michael Gabriel Agostinho Barbosa

Centro universitário vale do Ipojuca UNIFAVP/
WYDEN
Caruaru- PE

Severina Rodrigues de Oliveira Lins

Centro universitário vale do Ipojuca UNIFAVP/
WYDEN
Caruaru- PE

Rhaldney Kaio Silva Galvão

Centro Universitário UniFBV | Wyden

Patrícia Alves Genuíno

Centro Universitário UniFBV | Wyden
Boa viagem- PE

RESUMO: O HIV (vírus da imunodeficiência humana) foi reconhecido pela primeira vez na década de 80, onde a sociedade assistia de perto o polêmico surgimento da AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) e a morte de milhões de pessoas por todo o mundo. A descoberta do HIV soava como uma sentença de morte, tanto pela inexistência da cura ou tratamento, como por fatores sociais e econômicos. O primeiro tratamento foi aprovado em 1986, com o objetivo de impedir a replicação do vírus na corrente sanguínea de pessoas infectadas e evitar a sua evolução, porém

devido aos efeitos colaterais do tratamento e sucessivas mutações do vírus, o qual dificulta a descoberta de fármacos mais específicos, novos medicamentos foram desenvolvidos. Iniciaram-se as combinações de fármacos que bloqueiam as atividades das enzimas virais transcriptase reversa, protease e integrase. Foram desenvolvidos também fármacos adicionais que impedem a fusão do vírus com a célula do hospedeiro, assim, buscando impedir a disseminação do patógeno e proporcionar melhor qualidade de vida aos infectados pelo vírus HIV. Sobretudo a inclusão da adesão integrada do tratamento antirretroviral (TARV), proporciona um aumento contínuo a qualidade de vida do infectado, aumentando a imunidade, evitando assim, doenças oportunistas. Essa terapia conseguiu reduzir o uso de fármacos antirretrovirais em pacientes portadores HIV positiva.

PALAVRAS-CHAVE: Imunodeficiência; Tratamento Antirretroviral; vírus; atualidades.

1 | INTRODUÇÃO

O HIV/AIDS atinge diversos grupos, independente do sexo, gênero ou orientação sexual e, os números de adolescentes infectados nos últimos anos vêm se expandindo cada vez mais. Metade dos novos casos são de jovens na faixa etária entre 15 a 21 anos de

idade. Tem-se uma estimativa que 11,8 milhões de jovens de 15 a 24 anos vivem na atualidade com HIV/ AIDS em todo o mundo. Cada dia, cerca de 6 mil jovens dessa faixa etária se infectam com o HIV (MAIA., et al, 2019).

No Brasil, os primeiros casos de HIV e AIDS foram registrados em 1981, onde se tornou um marco na história da humanidade. Desde sua descoberta até o ano de 2002 foram notificados pela à Coordenação Nacional de DST e AIDS do Ministério da Saúde, 190.949 casos de AIDS (Brito., et al, 2011).

Tabela 01: a tabela a seguir demonstra os casos de AIDS/HIV registrados no Brasil, desde sua descoberta no ano de 1981 à 2002.

Atualmente, o número de pessoas infectadas é absurdamente assustador, como se pode comprovar pelos dados mostrados pelo Ministério da Saúde (Tabela 1).

Crianças	6.750
Adultos do sexo masculino	139.502
Adultos do sexo feminino	44.697
Total	190.949

Tabela 1. Registro de pessoas infectadas com HIV/AIDS no Brasil

Fonte: Ministério da saúde, 2019.

No início da descoberta do HIV/AIDS, ainda não havia tido a descoberta dos anti-retrovirais (terapia para tratamento e tentativa de eliminação, do organismo, de retrovírus 0) (MAIA., et al, 2019). De acordo com estes autores, mais de 30 milhões de pessoas em todo o mundo estão infectadas e o maior índice de indivíduos infectados vive em áreas pobres e sem recursos financeiros e social, principalmente na África Subsaariana e no sul e sudeste da Ásia. Além disso, estima-se que apenas metade ou dois terços das pessoas com HIV, atualmente, têm acesso ao tratamento. Nos Estados Unidos, estima-se que 1.122.900 pessoas estavam vivendo com o HIV em 2015, o que inclui uma estimativa do número de pessoas com HIV que ainda não sabem de seu diagnóstico.

Pesquisadores consideram que a melhor forma de controlar o vírus do HIV é minimizar a transmissão, implantando programas de educação, para propor o uso de preservativos e atribuir informações das formas de contágio. As formas principais de transmissão são: relações sexuais, transfusão sanguínea e perinatal, abrangendo a transmissão da mãe para o filho na gestação, parto ou amamentação; Há também a transmissão, por acidentes de trabalho em profissionais da área da saúde através de perfuro cortantes contaminados. Esses fatores de contaminação contribuem para a disseminação do vírus, sendo a sexual a mais eminente entre todas (Tortora, G.J. et al, 2012).

A zidovudina ou (AZT) foi um dos primeiros tratamentos antirretrovirais. O AZT foi sintetizado em 1964 pela primeira vez por Jerome Horwitz da instituição contra o câncer de Michigan, mas não obteve êxito em tumores de camundongos, onde em

1970 teve seus primeiros indícios como atividade anti-HIV; em 1986 foi aprovada como uma droga antiviral pela (“Food and Drug Administration”) (Almeida, 2013).

Os tratamentos de terapia antirretroviral (TARV) não têm como objetivo erradicar o vírus HIV, mas diminuir sua mobilidade e replicação, proporcionando um melhoramento contínuo a qualidade e expectativa de vida das pessoas infectadas pelo vírus (Oliveira., et al. 2013).

A não adesão desse tratamento é um dos grandes responsáveis pelas infecções oportunistas. Aproximadamente de 15% a 30% dos infectados pelo vírus HIV não tratados, desenvolvem infecções oportunistas como: pneumonia, causado pelo agente pneumocystis jiroveci (reativação de uma infecção latente prévia), dentre outros patógenos mais comuns estão: Cândida, citomegalovírus, microbactérias típicas e atípicas, toxoplasma gondii, cryptosporidium, vírus do herpes simples, papovavírus e Histoplasma capsulatum (Kumar, 2010).

Por isso, definir o melhor momento para o tratamento é uma das decisões mais importantes no acompanhamento clínico. (Ministério da Saúde, 2013). Pois a efetividade do tratamento antirretroviral (TARV) consiste especialmente da adesão dos pacientes aos medicamentos antivirais(Kumar, 2010).

2 | REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Estrutura do HIV

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), é uma infecção causada pelo retrovírus do grupo lentivírus. Essa família possui vírus capazes de provocar infecções persistentes, com evolução lenta. Por isso, produzem degeneração progressiva do sistema imune (Filho G., 2013).

O Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV) apresenta algumas características próprias, Dentre elas, a existência de uma camada mais externa, o envelope, que contém lipídeos e proteínas. As proteínas virais encontradas no envelope são as glicoproteínas 120 (gp120) e 41 (gp41). A gp120 é a mais externa, responsável pela ligação do vírus com as células hospedeiras e está ligada à gp41, que atravessa o envelope viral (Abba., et al, 2014).

Na parte interna do envelope viral, existe uma estrutura proteica constituída pela proteína 17 (p17). A estrutura seguinte é o capsídeo viral, constituído pela proteína p24, que envolve duas fitas de RNA (genoma viral) e as enzimas transcriptase reversa, integrase e protease (Werson, et al., 2013).

2.2 Mecanismos de ação do HIV

Para multiplicar-se no organismo humano, o HIV utiliza especialmente os linfócitos T-CD4, responsáveis pelo comando da resposta específica antígeno-anticorpo. Por meio da glicoproteína gp120, o vírus tem a capacidade de se ligar ao receptor CD4

(componente da membrana dos linfócitos) e penetrar nas células, usando o DNA destas para se multiplicar (Kumar, 2010). Ao completar seu ciclo reprodutivo, rompe a célula, causando sua morte; os novos vírus caem na corrente sanguínea, infestando outros linfócitos e continuando, assim, sua replicação (Ferreira, 2011).

A evolução pela infecção por HIV-1 consiste em um período agudo, uma fase de latência clínica, e uma fase final. Durante a fase aguda, de 2 - 3 semanas após o contágio pelo vírus HIV, aparecem sintomas da doença como febre e mal-estar, devido a uma queda dos níveis de T CD4+ (Silva, 2012). Na fase de latência clínica, a doença regride, diminuindo a viremia (fase assintomática) (Abbas, K.A., 2013).

Durante a fase de latência clínica, o exame físico costuma ser normal, exceto pela linfadenopatia, que poderá persistir mesmo após a fase aguda. Podem ocasionar algumas mudanças nos exames, como a plaquetopenia, mudanças também como anemia (normocrômica e normocítica) e leucopenia, enquanto os níveis de linfócitos T-CD4+ (LT-CD4+) ficam superiores de 350 células/mm³. Infecções bacterianas são frequentes, levando a infecções respiratórias, como por exemplo, tuberculoses.

A medida que a infecção progride, surgem febre baixa, perda ponderal, sudorese noturna, fadiga, diarreia crônica, cefaleia, alterações neurológicas, outras infecções bacterianas (pneumonia, sinusite, bronquite) e lesões orais, como a leucoplasia oral pilosa, além de herpes-zoster. Nesse período, já é possível encontrar diminuição na contagem de LT-CD4+, situada entre 200 e 300 células/mm³. Por consequência, dessa diminuição de células TCD4 por mm³ sanguíneo, os pacientes tornam-se ainda mais expostos a infecções (Ministério da saúde e Oliveira., et al 2013)

A fase final (AIDS) é diagnosticada quando a contagem de TCD4 fica abaixo de 200 células por mm³ sanguíneo (Abbas, 2013). Na fase final é comum a presença de infecções como: pneumonia, infecções por fungos, tuberculose, alguns tipos de câncer, problemas neurológicos e sarcoma de kaposi (Kumar, 2010).

2.3 Tratamentos do HIV

Com as sucessivas mutações do vírus, a medicina teve um novo desafio, elaborar novos fármacos para estabelecimento imunológico e evitar a imunodepressão. Com o passar dos tempos, então, foram formulados os seguintes antirretrovirais: Atripla e Eviplera que são combinações de doses fixas, inibidores nucleósidos/nucleótidos da transcriptase reversa análogos (INTR/INTRt) que é Combivir, Kivexa, Trizivir, Truvada, 3Tc, Abacavir, Azt, Ftc, tenofovir e os inibidores de transcriptase reversa não nucleósidos (ITRNN) que são: efavirenze, Etravirina, Nevirapina, Rilpivirina, também vieram os inibidores de protase (atazanavir, darunavir, Fosamprenavir, Lopinavir/ Ritonavir e tripanavir) e também o inibidor da integrase (Alcorn, 2013).

Os medicamentos usados para o tratamento de AIDS/HIV, não mata o vírus causador da imunodeficiência, mas ajudam ao sistema imunológico, por esse fato é de extrema importância desses medicamentos para quem é portador da AIDS ajudando para aumentar o tempo e a qualidade de vida (Ministério da saúde 2015).

Para que o indivíduo portador de aids tenha uma boa resposta ao tratamento é necessário utilizar pelo menos três antirretrovirais combinados. Esses pacientes que estão em tratamento é necessário que seja acompanhado de uma equipe multidisciplinar é indispensável a presença do médico para que assim se tenha uma análise completa da adaptação do organismo ao tratamento. Muitos dos pacientes encontram dificuldades para seguir as recomendações médicas durante o tratamento, já outros abandonam, por esse motivo é de fundamental importância que se tenha o diálogo com os profissionais de saúde para que assim os portadores compreenda todo o esquema de tratamento que está sendo submetido, e não reste nenhuma dúvida (Ministério da saúde. 2015).

Os diversos tipos de tratamento acompanham a qualidade de vida dos pacientes infectados pelo vírus, auxiliando no seu bem-estar, impedindo a evolução clínica do vírus e mantendo os níveis de TCD4 estáveis, melhorando o estado psicossocial do paciente (Ferreira, 2011).

2.4 HIV E SOCIEDADE

A discriminação tem consequências danosas e é um obstáculo aos programas de prevenção e controle da doença. Muitas pessoas, devido à discriminação e à estigmatização da AIDS, têm medo de procurar ajuda e acabam se afastando dos programas sociais criados para esse fim. Preferem ficar com a dúvida e ignorar o fato de poder ter o vírus a ter que enfrentar os estigmas e os preconceitos relacionados à doença.

Além do problema da discriminação para a saúde pública, o ser humano e sua dignidade são intensivamente afetados. Ao contrair o vírus, a morte é associada ao soropositivo, de modo que sua cidadania começa a desaparecer. Demissão do emprego, proibição de frequentar determinados lugares, desprezo, omissão no atendimento médico, abandono da família e amigos são as principais consequências que atingem a pessoa que contrai o vírus HIV. O portador passa a ser algo descartável e dispensável para a sociedade (Carvalho., et al. 2008).

Esses tipos de atitudes adotadas contra o soropositivo prejudicam seu tratamento e sua recuperação. Um ambiente acolhedor e amigável é essencial para a recuperação do portador do vírus HIV. Com a presença dos direitos humanos, todas essas atrocidades podem ser combatidas e evitadas (Carvalho., et al. 2008).

À sociedade caberia a tarefa de amenizar essa sensação, através da solidariedade, do afeto e da compreensão. Mas ao invés disso, decreta a morte civil dos portadores, negando-lhes direitos fundamentais e tratando-os como pessoas estigmatizadas. (OLIVEIRA, 2005).

“Lutar contra o preconceito vivido pelas pessoas, é entender que em um abraço, um beijo, segura a mão do próximo não irá te transmitir mal algum” (Galvão 2017).

2.5 SISTEMA IMUNOLÓGICO E O VIRÚS DA AIDS/HIV

O vírus da imunodeficiência humana (HIV), é responsável por causar defeitos progressivos da imunidade humoral e celular entre eles destaca a depleção de linfócito CD4, a ativação policlonal de linfócitos e o aumento da produção de imunoglobulinas o que resulta em uma evolução da doença devido a intensa resposta imunológica (Abbas., et al. 2014).

O vírus infecta as células dendríticas, os linfócitos t e os macrófagos, quando o paciente esta em tratamento os medicamentos e coquetéis utilizados são capazes de promover 99% dessas células infectadas, onde o 1% restante são macrófagos, ainda não foi descoberto a terapia para eliminar essas células que são resistentes a terapia disponível (Abbas., et al. 2014).

No ciclo de replicação viral, o vírus produz três proteínas são elas: a gp 120 que se projeta-se do envelope e interage com o CD4, a proteína gp41 faz a fusão entre o envelope e membrana celular e a p24 que pode ser utilizado como marcador sorológico da infecção (Abbas., et al. 2014).

2.6 NOVAS DESCOBERTAS SOBRE TRATAMENTOS CONTRA HIV.

Recentemente, pesquisadores Brasileiros, em parcerias com americanos descobriram que uma planta da flora brasileira, *Pulchellus abrus*, pode ajudar pacientes com HIV. No laboratório da USP, cientistas do Instituto de Física de São Carlos extraíram da semente da planta a toxina chamada pulchellina (PAC) que daria a esperança de um novo medicamento. Os resultados comprovam a eficácia da *Pulchellus abrus* como tratamento mais eficaz para o combate ao HIV.

A Pulchellina é um membro das proteínas do tipo II da família de inativação de ribossomos, presente na semente dessa planta. Os pesquisadores conseguiram formar um conjugado de Pulchellina com dois anticorpos monoclonais anti-HIV diferentes: MAb anti-gp120 924 ou anti-gp41 MAb 7B2 produzidos em laboratório.

Em parceria com a Health Sciences Center da Louisiana State University, nos Estados Unidos, os pesquisadores testaram a substância em células infectadas com o HIV, fornecidas por um hospital norte americano, e perceberam que a pulchellina após ter sido conjugada à ação de anticorpos usados especificamente na detecção do vírus foi capaz de combater células infectadas com o vírus, principalmente as que se encontram no sistema linfático, sem atingir glóbulos brancos sadios, diferentemente dos tratamentos atuais, trazendo assim, além de um tratamento terapêutico, a possível cura da AIDS.

2.7 novas descobertas: resistência imunológica contra o HIV

Pesquisadores descobrem que algumas pessoas soropositivo para HIV podem controlar a infecção naturalmente há mais de 3 décadas, em uma pesquisa realizada no ano de 2012 relacionou certas variantes específicas de uma proteína chamada HLA-B,

(O HLA-B é um gene humano onde sua função principal é fornecer instruções para fazer com que uma proteína desempenhe seu papel crítico no sistema imunológico. O HLA-B faz parte de uma família de genes chamada complexo antígeno leucocitário humano) (Galileu., 2019).

Um grupo de pesquisadores do Instituto de Tecnologia de Massachusetts descobriram que a presença do gene HLA B57 faz com que o organismo produza mais linfócitos T – glóbulos brancos que atuam na proteção contra infecções. Pessoas que tem esse gene tem uma produção maior de linfócitos T, onde faz o acoplamento com mais pedaços do vírus HIV, o resultado desse acoplamento contribui para o controle do vírus HIV (Fapespe. 2010).

3 | METODOLOGIA

Esta pesquisa retrata uma revisão de literatura, sendo, portanto qualitativa. A busca por artigos será realizada em bases de dados científicos como Scientific Electronic Library Online (SCIELO), Ministério da Saúde do Brasil, Biblioteca virtual de saúde (BIREME), Elton B. Stephens Company (EBSCO), Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (Lilacs), National Library of Medicine (Medline). Para melhor retratar o tema sugerido serão utilizados como critérios de inclusão artigos publicados nos últimos dez anos, nas línguas portuguesa, inglesa e espanhola. Serão utilizados os seguintes descritores: vírus da AIDS, HIV, coquetel anti HIV, qualidade de vida de pessoas soro positivas. Após a obtenção dos artigos, será realizada uma pré-análise, através da leitura global do texto, buscando selecionar apenas as obras que possuíam informações úteis para a pesquisa. Posteriormente, estas fontes serão exploradas detalhadamente e em seguida será realizada a organização das ideias extraídas referentes ao problema do trabalho, enfatizando a obtenção de argumentações para alcançar a compreensão das informações referentes ao tema da pesquisa.

4 | CONCLUSÕES

Contudo, as referências científicas, publicadas demonstram que a AIDS é diagnosticada quando a contagem de linfócitos TCD4 fica abaixo de 200 células por mm³ sanguíneo, trazendo manifestações infecciosas e algumas neoplasias, devido a diminuição dessas células de defesa (Abbas et al, 2013). Infecções como pneumonia, infecções por fungos, tuberculose, alguns tipos de câncer, problemas neurológicos e sarcoma de kaposi, são as mais frequentes e se não tratadas de forma rápida e corretas, estas doenças podem levar de forma rápida o soropositivo à morte (Abbas & Aster, 2010). A pandemia HIV/AIDS constitui um enorme desafio, tanto para o infectado pelo vírus quanto para o país. A AIDS trouxe diversos desafios no campo da ciência, mas também sociais. A literatura aponta que no Brasil o vírus e a doença evoluem

constantemente e que a cada ano novos aspectos dessa interação vírus-homens têm evoluído. Existem relatos que apontam a desigualdade, o preconceito, a hipocrisia e principalmente a fragilidade das relações humanitárias contra os soropositivos.

REFERÊNCIAS

BRITO, Ana Maria de et al. AIDS e infecção pelo HIV no Brasil: uma epidemia multifacetada. 2011.

MAIA, David de Alencar Correia et al. Notificação de casos de HIV/AIDS em adolescentes portadores de HIV/Aids no Nordeste: série histórica entre os anos de 2004 a 2014. **Revista Diálogos Acadêmicos**, v. 7, n. 1, 2019.

Abbas. Abul K; Andrew H. Lichtman; Shiv Pillai. Imunologia básica; funções e distúrbios do sistema imunológico. Editora: Elsevier. 3ª Tiragem. 4ª Edição. 2014.

Ferreira, Brunno Elias; oliveira, Isabele Mendes; Paniago, Anamaria Mello Miranda. Qualidade de vida de portadores de HIV/AIDS e sua relação com linfócitos CD4+, carga viral e tempo de diagnóstico. Campo Grande. 2011.

Carvalho, Gisele dos Santos. Pessoas vivendo com HIV/AIDS: Vivências do tratamento antirretroviral. Universidade Estadual de Londrina. Londrina. 2008.

Kumar, Abbas, Fausto, Aster. Patologia: Robbins e Cotran: Bases Patológicas das Doenças. Editora: Elsevier Ltda. 8ª Edição. 5ª Tiragem. Rio de Janeiro.

Ministério da Saúde. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos. Brasília-DF. 2013.

Ministério da Saúde. Direitos Humanos e HIV/AIDS. Brasília-DF. 2008.

Almeida. Mauro Vieira de; Souza. Marcus Vinicius Nora de. Drogas anti-HIV: passado, presente e perspectivas futuras. Química nova. Volume: 26. N.3. São Paulo. 2013.

OLIVEIRA, Tatyane Guimarães. AIDS e discriminação: Revista Jus Navigandi, ISSN 1518-4862, Teresina, ano 10, n. 762, 5 ago. 2005.

Site confiável: Revista Galileu: Cientistas estudam por que algumas pessoas são naturalmente imunes ao HIV. Publicado em 03/05/2019. Acessado em 27 de junho de 2019.

Site confiável: Agencia FAPESPE: Imunidade natural contra HIV 06 de maio de 2010. Acessado em 27 de junho de 2019.

Lactobacillus fermentum: POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO PARA APLICAÇÕES NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA E ALIMENTÍCIA

Data de aceite: 10/12/2019

Brenda Ferreira de Oliveira

Universidade CEUMA, Curso de Biomedicina.
São Luís, Maranhão.

Amanda Caroline de Souza Sales

Universidade CEUMA, Curso de Biomedicina.
São Luís, Maranhão.

Daniele de Aguiar Moreira

Universidade CEUMA, Curso de Biomedicina.
São Luís, Maranhão.

Mari Silma Maia da Silva

Universidade CEUMA, Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana. São Luís, Maranhão.

Gabrielle Damasceno Evangelista Costa

Universidade CEUMA, Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana. São Luís, Maranhão.

Gustavo Henrique Rodrigues Vale de Macedo

Universidade CEUMA, Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana. São Luís, Maranhão.

Lívia Muritiba Pereira de Lima Coimbra

Universidade CEUMA, Curso de Nutrição e Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (REDE BIONORTE).
São Luís, Maranhão.

Rita de Cássia Mendonça de Miranda

Universidade CEUMA, Programa de Pós-

graduação em Meio Ambiente, Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana e Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (REDE BIONORTE).
São Luís, Maranhão.

Adrielle Zagnignan

Universidade CEUMA, Curso de Nutrição e Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (REDE BIONORTE).
São Luís, Maranhão.

Luís Cláudio Nascimento da Silva

Universidade CEUMA; Curso de Biomedicina, Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana, Programa de Pós-graduação em Odontologia e Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (REDE BIONORTE).
São Luís, Maranhão.

RESUMO: Probióticos são definidos como suplementos alimentares à base de microrganismos vivos que promovem benefícios através da interação com a microbiota intestinal. Estas preparações atuam diretamente na resistência a infecções, no melhor aproveitamento de vitaminas e também estão envolvidos na fisiopatologia de diversas doenças. *Lactobacillus fermentum* é uma bactéria frequentemente utilizada por apresentar características desejáveis, como alta tolerância ao pH e a sais biliares, capacidade

de autoagregação e combate ao estresse oxidativo. Produtos à base de *L. fermentum* reduzem ainda significativamente as taxas lipídicas, demonstrando influência sobre doenças relacionadas a distúrbios inflamatórios e metabólicos. Acrescido a isto, diversos compostos bioativos produzidos por isolados de *L. fermentum* têm sido isolados, como bacteriocinas, exopolissacarídeos, enzimas e peptídeos, apresentando atividade inibitória frente a patógenos como *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis* e *Staphylococcus aureus*; e diminuindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, a utilização *L. fermentum* em formulações não lácteas têm sido bastante exploradas, como os sucos e derivados. Assim, a aplicação de *L. fermentum* em diversos segmentos nutricionais e terapêuticos tem sido amplamente estudada, mostrando a importância deste microrganismo como mediador na interação microbiota e saúde.

PALAVRAS-CHAVE: Probióticos, Microbiota Intestinal, Modulação do sistema Imune.

ABSTRACT: Probiotics are defined as food supplements based on living microorganisms that promote benefits through interaction with the intestinal microbiota. These preparations act directly on resistance to infections, on better utilization of vitamins and are also involved in the pathophysiology of various diseases. *Lactobacillus fermentum* is a bacterium often used because it has desirable characteristics, such as high tolerance to pH and bile salts, self-aggregation capacity and combat oxidative stress. *L. fermentum*-based products are also able to significantly reduce lipid rates, demonstrating influence on diseases related to inflammatory and metabolic disorders. In addition, several bioactive compounds produced by *L. fermentum* have been isolated such as bacteriocins, exopolysaccharides, enzymes and peptides, showing inhibitory activity against pathogens such as *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis* and *Staphylococcus aureus*; and decreasing secretion of proinflammatory cytokines. In addition, the use of *L. fermentum* in non-dairy formulations has been widely explored, such as juices and derivatives. Thus, the application of *L. fermentum* in various nutritional and therapeutic segments has been widely studied, showing the importance of this microorganism as a mediator in the microbiota interaction and health.

KEYWORDS: Probiotics, Intestinal Microbiota, Immune System Modulation.

1 | INTRODUÇÃO

Os nutrientes básicos e os suplementos funcionais podem proporcionar benefícios nutricionais, melhorando assim, a saúde dos indivíduos que os consomem. Esses tipos de nutrientes, quando associados a uma dieta equilibrada, controlam variadas funções corporais, colaborando na proteção contra doenças como hipertensão, diabetes e osteoporose (KHALESI et al., 2018). Estas ações benéficas têm motivado o desenvolvimento de alimentos que promovam o bem-estar físico e mental daqueles que os consomem. Essa tendência favorece o consumo de alimentos enriquecidos em compostos fisiologicamente ativos, como vitaminas, minerais, fibras dietéticas, óleos, esteróis e probióticos (MITROPOULOU et al., 2013; EMSER et al., 2017).

Segundo Fernandez Alarcon (2015), os probióticos foram determinados como suplementos alimentares derivados de microrganismos vivos, promovendo benefícios através da interação com a microbiota intestinal. Estudos têm demonstrado que a ingestão de probióticos induzem vários benefícios à saúde, como melhora dos movimentos realizados pelos órgãos do sistema digestivo, controle da hipercolesterolemia, diabetes e da hipersensibilidade (CAI et al., 2018; HE; ZHANG; HAN, 2017; MENNINI et al., 2017).

Dentre as bactérias probióticas, a espécie *Lactobacillus fermentum* tem se destacado graças ao seu potencial terapêutico, que incluem o tratamento de infecções vaginais e intestinais (RODRÍGUEZ-NOGALES et al., 2017; MARTINS; SILVA; NICOLI, 2018). Trata-se de um microrganismo Gram-positivo, anaeróbio facultativo, que é encontrado no trato gastrointestinal, boca, leite materno e na vagina (BOND; MORRIS; NASSAR, 2017; OUARABI et al., 2017; VERCE; DE VUYST; WECKX, 2018). Estudos têm demonstrado que produtos lácteos fermentados por *L. fermentum* são eficientes no combate de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, distúrbios inflamatórios, dislipidemias e diabetes, além de ter efeito anti-obesidade (YADAV et al., 2018).

Tradicionalmente, os produtos enriquecidos com probióticos são leites fermentados e iogurtes, sendo estes consumidos em todo o mundo (DE PRISCO; MAURIELLO, 2016). No entanto, existe uma crescente demanda para produtos probióticos não lácteos, atendendo principalmente os consumidores que apresentam prevalência de alergia a produtos lácteos e intolerância à lactose e as necessidades do crescente mercado vegetariano (KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2016; NEMATOLLAHI et al., 2016). Neste contexto, os sucos de frutas – devido ao alto valor nutricional – são apontados como uma alternativa interessante para o desenvolvimento de bebidas fermentadas com probióticos, contanto que possuam açúcares fermentáveis em suas composições (DI CAGNO et al., 2013; FARIAS; SOARES; GOUVEIA, 2016; NEMATOLLAHI et al., 2016; SANTOS; ANDRADE; GOUVEIA, 2017).

2 | CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE LACTOBACILLUS FERMENTUM

Segundo Pimentel (2012), o conceito internacional aceito é de que os suplementos alimentares ricos em probióticos (microrganismos vivos), quando aplicados em quantidades adequadas, trazem benefícios à saúde humana. Isto se dá pelos efeitos dos probióticos na microbiota intestinal, que por sua vez exerce papel crucial no desenvolvimento do sistema imunológico, resistência a infecções, induzem maior digestibilidade, melhor aproveitamento de vitaminas e também estão envolvidos na patogênese de diversas doenças como diabetes (KIM; KEOGH; CLIFTON, 2017; VÁZQUEZ-CASTELLANOS et al., 2018; MU et al., 2018; HOJSAK et al., 2018). O uso de probióticos tem sido comprovadamente eficaz no tratamento e/ou prevenção de

doenças diarreicas, câncer, constipação e infecções em geral (WARDILL et al., 2018; WEGH; BENNINGA; TABBERS, 2018; LAURSEN; HOJSK, 2018).

Os probióticos podem ser obtidos em diversas preparações lácteas como iogurtes, queijo e no leite fermentado. Atualmente, também há um maior interesse em alimentos vegetais contendo probióticos, devido ao grande número de indivíduos com alergia a produtos derivados do leite, intolerância a lactose ou veganos (PUERARI; MAGALHÃES-GUEDES; SCHWAN, 2015).

As principais bactérias probióticas são as bifidobactérias e os lactobacilos. Neste trabalho, foi explorada a bactéria *Lactobacillus fermentum* que se trata de uma espécie Gram-positiva, anaeróbia facultativa, não formadora de esporo, imóvel e que tem a capacidade de transformar açúcares em ácido lático que pode ser encontrada em diversos animais (PAULA, 2010).

Nos seres humanos, este microrganismo pode ser encontrado em órgãos e fluídos, como no trato gastrointestinal, boca, leite materno e a vagina (BOND; MORRIS; NASSAR, 2017; OUARABI et al., 2017; VERCE; DE VUYST; WECKX, 2018). Como outras espécies de lactobacilos, *L. fermentum* possui uma forte tolerância ao pH e a sais biliares, sendo capaz de crescer e sobreviver nestas condições adversas (COELHO, 2013).

L. fermentum também apresenta capacidade de se autoagregar, característica importante para garantir uma maior permanência no intestino, aumentando as interações com as células epiteliais e com o sistema imunológico do hospedeiro (MELO et al., 2017). As bactérias desta espécie, em geral, são intrinsecamente resistentes a antibióticos da classe das quinolonas, trimetoprim, sulfonamidas, vancomicina e a maioria dos inibidores de ácido nucléico, enquanto apresentam suscetibilidade a inibidores da síntese de proteínas, com exceção dos aminoglicosídeos (MATHUR et al., 2005; KLARE et al., 2007; MELO et al., 2017).

Outra importante ação terapêutica de *L. fermentum* foi revelada no estudo de Athari et al., (2018) que demonstrou que camundongos que receberam diversos probióticos, incluindo *L. fermentum*, por 8 semanas apresentaram melhora nos déficits de memória, aprendizado e estresse oxidativo em um modelo experimental da doença de Alzheimer. Estes resultados foram associados a modificação da microbiota gastrintestinal e melhora nos biomarcadores do estresse oxidativo (tais como aumento dos níveis de malonaldeído e atividade da superóxido dismutase).

Estudos com a linhagem *L. fermentum* mostraram uma ação inibitória na lesão gástrica induzida por ácido clorídrico ou etanol em experimentos com camundongos (SUO et al., 2016). Evidências também sugerem o efeito benéfico de *L. fermentum* nos níveis de lipídeos. Em um modelo murino de hipercolesterolemia, foi comprovado que a ingestão de *L. fermentum* FTDC 8312 por sete dias resultou na redução nos níveis séricos de colesterol total e lipoproteína de baixa densidade. A administração do FTDC 8312 também alterou a microbiota intestinal, com um aumento nos membros dos gêneros Akkermansia e Oscillospira, afetando o metabolismo lipídico e a excreção

fecal de bile nos camundongos (LYE et al., 2017).

Em um trabalho recente, foram avaliadas as propriedades adesivas e anti-inflamatórias das linhagens de *L. fermentum* MCC 2759 e MCC 2760. O estudo demonstrou que ambas as cepas tiveram capacidade de aderir nas linhagens celulares Caco-2 e HT-29. Essa adesão foi mediada por carboidratos e proteínas e foi observada a expressão do gene da proteína de ligação à mucina (mub) na presença de mucina, bÍlis e pancreatina. As cepas de *L. fermentum* também estimularam a expressão de citocinas inflamatÓrias em células Caco-2. No entanto, na presença de LPS, os genes pró-inflamatÓrios foram regulados negativamente e a IL-10 foi regulada positivamente pelas culturas. Essas propriedades incentivam o uso destas linhagens como probióticos (CATHERINE; KURREY; HALAMI, 2018).

3 | LACTOBACILLUS FERMENTUM EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFECÇÃO

Em relação às ações terapêuticas, linhagens de *L. fermentum* têm sido eficazes para o tratamento de infecções vaginais e intestinais (CARMO et al., 2016; RODRÍGUEZ-NOGALES et al., 2017; MARTINS; SILVA; NICOLI, 2018). A seguir são apresentados alguns estudos onde *L. fermentum* foi aplicado em modelos de infecção experimentais *in vitro* e *in vivo*.

Carmo et al. (2016) avaliaram o uso de diversas espécies de lactobacilos como meios alternativos no controle de infecções microbiana no trato genital causadas por *Candida albicans*. Foram utilizados os seguintes critérios: (I) adesão a células epiteliais do hospedeiro e muco, (II) formação de biofilme, (III) co-agregação com patógenos bacterianos, (IV) inibição da adesão de patógenos ao muco e células HeLa e (V) atividade antimicrobiana. As espécies testadas aderiram à mucina, co-agregaram com os microrganismos genitais e exibiram atividade antimicrobiana.

Com exceção de *L. acidophilus* e *L. paracasei*, todas as linhagens testadas aderiram às células HeLa. Dentre as linhagens avaliadas, apenas *L. fermentum* ATCC 23271 produziu um biofilme moderado e um nível mais alto de co-agregação e ligação de mucina. O ensaio de deslocamento demonstrou que todas as cepas de *Lactobacillus* inibiram a ligação de *C. albicans* à mucina, provavelmente devido à produção de substâncias com atividade antimicrobiana. Os isolados clÍnicos pertencentes às espécies mais comuns de *Candida* associadas à candidÍase vaginal foram inibidos por *L. fermentum* ATCC 23271. Baseados nestes resultados, os autores sugeriram que *L. fermentum* ATCC 23271 é um potencial candidato a probiótico, particularmente utilizados para complementar o tratamento da candidÍase, uma vez que apresentou o melhor perfil probiótico em comparação com as outras cepas testadas de lactobacilos (CARMO et al., 2016).

O efeito de *L. fermentum* 137 e de seu sobrenadante (livre de células) foi avaliado na infecção causada por *Gardnerella vaginalis* e *C. albicans*. O tratamento resultou

na diminuição da secreção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8) e diminuição da ativação de NF-kB nas células HeLa infectadas com ambos os patógenos (MARTINS; SILVA; NICOLI, 2018). A cepa de *L. fermentum* Lf137 foi eficaz no tratamento de infecção vaginal por *G. vaginalis* em modelo murino (MARTINS; SILVA; NICOLI, 2018).

Em outro estudo foi analisada a ação de *L. fermentum* 8711 contra *S. aureus* resistente à metilina (MRSA). Foi demonstrado que esta cepa possui a capacidade de aderir à célula de adenocarcinoma do cólon humano (Caco-2). Na presença de *L. fermentum* 8711, foi observado diminuição na capacidade de MRSA em aderir nas células Caco-2. Já no ensaio de citotoxicidade, pode se observar que *L. fermentum* não apresentou efeito citotóxico e também reduziu significativamente a citotoxicidade induzida por MRSA. O efeito protetor ocorreu sem afetar a morfologia e viabilidade das células Caco-2 (JAYASHREE et al., 2018). Foi também reportado que *L. fermentum* CECT 5716 diminuiu a carga de *Staphylococcus* no leite materno de mães lactantes que sofrem de dor mamária (MALDONA-LOBON et al., 2015).

O potencial antimicrobiano de *L. fermentum* também foi avaliado contra *Helicobacter pylori* utilizando *Meriones unguiculatus* como modelo. Neste trabalho foram avaliadas propriedades de uma linhagem probiótica isolado do suco gástrico humano, denominado UCO-979C que inibiu fortemente a infecção causada por *H. pylori* SS1 (MERINO et al., 2018).

Cepas de *L. fermentum* também demonstraram ação contra a infecção causada por vírus da influenza (YOUN et al., 2012; YEO et al., 2014). Por exemplo, a cepa de *L. fermentum* CJL-112 aplicada por via nasal melhorou a resistência contra a infecção letal por influenza em camundongos e galinhas, ativando a resposta Th1, IL-2 e IFN- γ . Além disso, os níveis específicos de IgA anti-influenza estavam elevados significativamente nos camundongos tratados (YEO et al., 2014).

4 | AÇÃO ANTIOXIDANTE DE *L. FERMENTUM*

Radicais livres são moléculas liberadas pelo metabolismo do corpo que apresentam um número ímpar de elétrons instáveis e reativos na sua órbita externa, sendo assim, capazes de causar dano oxidativo nas macromoléculas presentes nas células (DNA, proteínas e lipídios) (NASCIMENTO DA SILVA et al., 2015). Devido a estas propriedades, as espécies reativas estão relacionadas com a patogênese de diversas doenças degenerativas como o câncer, mal de Alzheimer e o envelhecimento precoce (ALVAREZ-PARRILLA et al., 2007; POPRAC et al., 2017).

Cepas de *L. fermentum* têm sido apontadas como capazes de inibir espécies reativas em modelos *in vitro* e *in vivo* (PERSICHETTI et al., 2014). A atividade antioxidante de diversas cepas orais de *Lactobacillus*, foi avaliada utilizando diversos métodos *in vitro*. Os resultados revelaram que as linhagens de *L. fermentum*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus* apresentam elevada ação antioxidante além da capacidade

de sobreviver sob estresse oxidativo (CHLOORUK; PIWAT; TEANPAISAN, 2017). Em outro estudo, foi demonstrado que cepas de *L. fermentum* isoladas de um chá tradicional tailandês chamado *Miang* apresentaram ação antioxidante e antimicrobiana (KLAYRAUNG; OKONOGLI, 2009).

Wang et al. (2009) também demonstraram que *L. fermentum* apresenta capacidade de sequestrar radicais livres in vitro e que a suplementação com este probiótico aumentou a defesa antioxidante de porcos, e conseqüentemente poderia levar a uma melhor qualidade da carne suína. Em outro estudo foi avaliado a capacidade antioxidante e os efeitos do *L. fermentum* CEC5716 na lesão intestinal em camundongos Balb/c. O probiótico foi administrado antes e após a indução da colite com ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS).

Foi observado que os animais tratados com *L. fermentum* CEC5716 apresentaram aceleração da recuperação da colite, podendo ser associado a uma função aumentada do receptor do tipo Toll (MAÑÉ et al., 2009). De igual modo, o uso de *L. fermentum* Lf1 resultou na melhoria da colite em modelos de camundongos DSS, devido a ação antioxidante de uma cepa probiótica nativa (CHAUHAN et al., 2014).

5 | PRINCIPAIS COMPOSTOS BIOATIVOS PRODUZIDOS POR *L. FERMENTUM*

As propriedades terapêuticas das cepas de *L. fermentum* tem levado ao isolamento e caracterização de diversos compostos bioativos, dentre eles bacteriocinas, exopolissacarídeos, enzimas e peptídeos (SABIA et al., 2014). A seguir são apresentadas algumas moléculas isoladas de *L. fermentum* e suas atividades biomédicas.

A fermencin SD11 é uma bacteriocina produzida por *L. fermentum* SD11 que apresentou atividade contra uma série de microrganismos orais, incluindo patógenos cariogênicos, periodontogênicos e *Candida* sp. (WANNUN; PIWAT; TEANPAISANR, 2016; ALE et al., 2017). A linhagem *L. fermentum* CS57 secreta bacteriocina (BLS) com ações inibitória a *Streptococcus agalactiae* e *Candida albicans* (SABIA et al., 2014).

Kaur et al. (2013) purificaram a fermenticina, um peptídeo antimicrobiano da classe IIa, produzido por *L. fermentum* HV6b MTCC10770 isolado da flora vaginal. Este peptídeo foi capaz de inibir o crescimento de diversos patógenos, por exemplo *Gardnerella vaginalis*, *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp. relacionados a vaginose bacteriana em humanos. Outros produtos com ação antimicrobiana produzidos por *L. fermentum* são os biossurfactantes que são eficazes na redução da adesão e produção de biofilmes bacterianos (TAHMOURESPOUR et al., 2011).

Já em estudos recentes com outra linhagem de *L. fermentum* (Lf2) foi demonstrado os aspectos funcionais de exopolissacarídeos (EPS) destacando por sua vez, aplicação como aditivo ao iogurte e leite. O EPS, em uma quantidade normal para utilização suplementar, proporciona proteção contra a infecção por *Salmonella*,

mostrando assim, uma forma de alcançar benefícios à saúde, colaborando com as características do iogurte (ALE et al., 2017).

6 | LACTOBACILLUS FERMENTUM E O DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS PROBIÓTICOS

Devido ao potencial terapêutico das cepas de *L. fermentum*, diversos produtos fermentados têm sido desenvolvidos e aplicados no combate de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, distúrbios inflamatórios, dislipidemias e diabetes, além de ter efeito anti-obesidade (YADAV et al., 2018).

O efeito anti-obesidade do leite desnatado acompanhado com ácido linoleico preparado com *L. fermentum* DDHI27, foi demonstrado em camundongos. O produto probiótico reduziu o peso corporal, as gorduras, sendo observada uma melhora no perfil lipídico, nos níveis de hormônios peptídicos, de glicose no sangue, acúmulo de gordura no fígado e redução no tamanho dos adipócitos (DAHIYA; PUNIYA, 2018). Efeitos hipolipidêmicos foram demonstrados para os produtos fermentados por *L. fermentum* H9, gerados pela reação de Maillard obtidos pela reação de caseína e lactose. Neste estudo foram utilizados ratos alimentados com dieta rica em gordura e colesterol que quando tratados com o produto fermentado apresentaram redução no acúmulo de lipídeos no fígado e nos tecidos da aorta (OH NS et al., 2016).

Musa et al. (2017) utilizaram o leite de vaca fermentado com *L. fermentum* LAB9 ou *L. casei* LABPC a fim de retardar o avanço da doença de Alzheimer. No modelo foi utilizado lipopolissacarídeo como indutor de neuroinflamação e consequente déficit de memória. Os autores demonstraram que o leite fermentado possui ação neuroprotetora reduzindo o déficit de memória.

7 | LACTOBACILLUS FERMENTUM E O DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS PROBIÓTICOS A PARTIR DE SUCOS DE FRUTAS

Como explicado anteriormente, a crescente demanda por formulações probióticas não lácteas tem levado ao desenvolvimento de produtos contendo *Lactobacillus* a partir de vegetais e frutas. São vários os exemplos utilizando cepas de *L. fermentum*. Um estudo recente averiguou o potencial antidiabético do suco de *Hericium erinaceus* fermentado por *L. fermentum* HP3 em ratos Wistar machos com diabetes mellitus (DM). A suplementação com o suco probiótico melhorou a massa corporal, o nível de insulina e o progresso da recuperação da hiperglicemia (CHAIYASUT et al., 2018). Resultados semelhantes foram observados para os sucos de *Syzygium cumini* e *Momordica charantia* fermentados com *L. fermentum* que exibiram atividades hipoglicêmica e hipolipemiante em camundongos (YOUSAF et al., 2017).

Em outra pesquisa foi possível comprovar que a fermentação com *L. fermentum* é capaz de metabolizar o ácido cítrico, resultando no melhoramento do sabor (relação

açúcar-ácido) do suco cítrico. A cepa de *L. fermentum* no decorrer da fermentação pode utilizar o ácido cítrico, a fim de sustentar o crescimento, sem o consumo de açúcar (YU et al., 2015).

8 | CONCLUSÃO

Observou-se que a aplicação de probióticos, como *Lactobacillus fermentum*, tem sido crescente em diversos segmentos nutricionais e terapêuticos, e seu uso mostra uma perspectiva promissora para a otimização de serviços de saúde nas áreas alimentar e farmacêutica.

Desta forma, a utilização de probióticos demonstra uma grande evolução na aplicação de microrganismos como mediadores da interação microbiota e saúde, estando estes diretamente relacionados a benefícios quando consumidos adequadamente.

REFERÊNCIAS

ALE, Elisa C., et al. Exopolysaccharide from *Lactobacillus fermentum* Lf2 and its functional characterization as a yogurt additive. *Journal of Dairy Research*, 2016, 83.4: 487-492.

ALVAREZ-PARRILLA, E., et al. Total phenols and antioxidant activity of commercial and wild mushrooms from chihuahua, mexico fenoles totalesy capacidad antioxidante de hongos comercialesy silvestres de chihuahua, méxico. *CYTA-Journal of Food*, 2007, 5.5: 329-334.

ATHARI NIK AZM, Somayeh, et al. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Ameliorate Memory and Learning Deficits and oxidative stress in A β (1-42) Injected Rats. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 2018.

BOND, Diana M.; MORRIS, Jonathan M.; NASSAR, Natasha. Study protocol: evaluation of the probiotic *Lactobacillus Fermentum* CECT5716 for the prevention of mastitis in breastfeeding women: a randomised controlled trial. *BMC pregnancy and childbirth*, v.17, n.1, p.148,2017.

BOND, Diana M.; MORRIS, Jonathan M.; NASSAR, Natasha. Study protocol: evaluation of the probiotic *Lactobacillus Fermentum* CECT5716 for the prevention of mastitis in breastfeeding women: a randomised controlled trial. *BMC pregnancy and childbirth*, v.17, n.1, p.148,2017.

CAI, Jiayi, et al. Comparative efficacy and tolerability of probiotics for antibiotic-associated diarrhea: Systematic review with network meta-analysis. *United European gastroenterology journal*, 2018, 6.2: 169-180.

CARMO, M. S. D., NORONHA, F. M., ARRUDA, M. O., COSTA, Ê. P., BOMFIM, M. R., MONTEIRO, A. S., & MONTEIRO-NETO, V. (2016). *Lactobacillus fermentum* ATCC 23271 Displays In vitro Inhibitory Activities against *Candida* spp. *Frontiers in microbiology*, 7, 1722

CARMO, M. S. D., NORONHA, F. M., ARRUDA, M. O., COSTA, Ê. P., BOMFIM, M. R., MONTEIRO, A. S., ... & MONTEIRO-NETO, V. (2016). *Lactobacillus fermentum* ATCC 23271 Displays In vitro Inhibitory Activities against *Candida* spp. *Frontiers in microbiology*, 7, 1722

CATHERINE, Archer Ann; KURREY, Nawneet K.; HALAMI, Prakash M. In vitro adhesion and anti-inflammatory properties of native *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus delbrueckii* spp. *Journal of applied microbiology*, 2018.

- CHAIYASUT, Chaiyavat, et al. Lactobacillus fermentum HP3–Mediated Fermented Hericium erinaceus Juice as a Health Promoting Food Supplement to Manage Diabetes Mellitus. **Journal of evidence-based integrative medicine**, 2018, 23: 2515690X18765699.
- CHAUHAN, Ritu, et al. Amelioration of colitis in mouse model by exploring antioxidative potentials of an indigenous probiotic strain of Lactobacillus fermentum Lf1. **BioMed research international**, 2014, 2014.
- COELHO, Julise Gonzalez. **Potencial probiótico de bactérias do gênero bacillus**. Monografia (Engenharia de Alimentos), 2013.
- DAHIYA, Dinesh K.; PUNIYA, Anil K. Conjugated linoleic acid enriched skim milk prepared with Lactobacillus fermentum DDHI27 endorsed antiobesity in mice. **Future microbiology**, n.00,2018.
- DE PRISCO, Annachiara; MAURIELLO, Gianluigi. Probiotication of foods: A focus on microencapsulation tool. **Trends in Food Science & Technology**, v.48, n.01, p. 27-39,2016.
- FARIAS, Natalie; SOARES, Mariana; GOUVEIA, Ester. Enhancement of the viability of Lactobacillus rhamnosus ATCC 7469 in passion fruit juice: Application of a central composite rotatable design. **LWT-Food Science and Technology**, v.71, p.149-154,2016.
- HE, Jun; ZHANG, Fan; HAN, Yan. Effect of probiotics on lipid profiles and blood pressure in patients with type 2 diabetes: A meta-analysis of RCTs. **Medicine**, 2017, 96.51: e9166.
- HOJSAK, Iva, et al. Guidance on the use of probiotics in clinical practice in children with selected clinical conditions and in specific vulnerable groups. **Acta Paediatrica**, 2018, 107.6: 927-937.
- JAYASHREE, Sathyanarayanan, et al. Anti-adhesion Property of the Potential Probiotic Strain Lactobacillus fermentum 8711 Against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA). **Frontiers in microbiology**, 2018, 9: 411.
- KHALESI, Saman, et al. A review of probiotic supplementation in healthy adults: helpful or hype? **European journal of clinical nutrition**, 2018, 1.
- KLARE, Ingo et al. Antimicrobial susceptibilities of Lactobacillus, Pediococcus and Lactococcus human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 900-912, 2007.
- KLAYRAUNG, Srikanjana; OKONOGI, Siriporn. Antibacterial and antioxidant activities of acid and bile resistant strains of Lactobacillus fermentum isolated from miang. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2009, 40.4: 757-766.
- KUMAR, Bathal Vijaya; VIJAYENDRA, Sistla Venkata Naga; REDDY, Obulam Vijaya Sarathi. Trends in dairy and non-dairy probiotic products-a review. **Journal of food science and technology**, V.52, n.10, p.6112-6124,2016.
- LAURSEN, Rikke Pilmann; HOJSAK, Iva. Probiotics for respiratory tract infections in children attending day care centers—a systematic review. **European journal of pediatrics**, 2018, 1-16.
- LYE, Huey-Shi, et al. Lactobacillus fermentum FTDC 8312 combats hypercholesterolemia via alteration of gut microbiota. **Journal of biotechnology**, 2017, 262: 75-83.
- MALDONADO-LOBÓN, Jose A., et al. Lactobacillus fermentum CECT 5716 reduces Staphylococcus load in the breastmilk of lactating mothers suffering breast pain: A randomized controlled trial. **Breastfeeding medicine**, v.10, n.9, p.425-432, 2015.

- MARTINS, Flaviano S.; SILVA, Aristóboło M.; NICOLI, Jacques R. Anti-inflammatory effect of two Lactobacillus strains during infection with Gardnerella vaginalis and Candida albicans in a HeLa cell culture model. **Microbiology Society**, 2018.
- MARTINS, Flaviano S.; SILVA, Aristóboło M.; NICOLI, Jacques R. Anti-inflammatory effect of two Lactobacillus strains during infection with Gardnerella vaginalis and Candida albicans in a HeLa cell culture model. **Microbiology Society**, 2018.
- MATHUR, Shalini; SINGH, Rameshwar. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. **International journal of food microbiology**, v. 105, n. 3, p. 281-295, 2005.
- MELO, Tauá Alves, et al. Functional profile evaluation of Lactobacillus fermentum TCUESC01: a new potential probiotic strain isolated during cocoa fermentation. **BioMed research international**, 2017.
- MELO, Tauá Alves, et al. Functional profile evaluation of Lactobacillus fermentum TCUESC01: a new potential probiotic strain isolated during cocoa fermentation. **BioMed research international**, 2017.
- MENNINI, Maurizio, et al. Probiotics in asthma and allergy prevention. **Frontiers in pediatrics**, v.5, n.165, p.1-5,2017.
- MERINO, J. S., et al. Lactobacillus fermentum UCO-979C strongly inhibited Helicobacter pylori SS1 in Meriones unguiculatus. **Beneficial microbes**, 2018, 1-4.
- MITROPOULOU, Gregoria, et al. Immobilization technologies in probiotic food production. **Journal of nutrition and metabolism**, p.1 – 15, 2013.
- MUSA, Nurul Huda, et al. Lactobacilli-fermented cow's milk attenuated lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and memory impairment in vitro and in vivo. **Journal of Dairy Research**, 2017, p.84.4: 488-495.
- NASCIMENTO DA SILVA, Luis Claudio et al. In vitro cell-based assays for evaluation of antioxidant potential of plant-derived products. **Free radical research**, v. 50, n. 8, p. 801-812, 2016.
- NEMATOLLAHI, Amene, et al. Viability of probiotic bacteria and some chemical and sensory characteristics in cornelian cherry juice during cold storage. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.21, p.49-53,2016.
- NEMATOLLAHI, Amene, et al. Viability of probiotic bacteria and some chemical and sensory characteristics in cornelian cherry juice during cold storage. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.21, p.49-53,2016.
- OH, Nam Su, et al. Hypolipidemic and antiinflammatory effects of fermented Maillard reaction products by Lactobacillus fermentum H9 in an animal model. **Journal of dairy science**, 2016, 99.12: 9415-9423.
- OUARABI, Liza, et al. Newly Isolated Lactobacilli strains from Algerian Human Vaginal Microbiota: Lactobacillus fermentum Strains Relevant Probiotic's Candidates. **Probiotics and antimicrobial proteins**, 2017, p.1-12.
- OUARABI, Liza, et al. Newly Isolated Lactobacilli strains from Algerian Human Vaginal Microbiota: Lactobacillus fermentum Strains Relevant Probiotic's Candidates. **Probiotics and antimicrobial proteins**, 2017, p.1-12.
- PARK, Jong Ho; KIM, Younghoon; KIM, Sae Hun. Green tea extract (Camellia sinensis) fermented by Lactobacillus fermentum attenuates alcohol-induced liver damage. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, 2012, 76.12: 2294-2300.

PAULA, Aline Teodoro de. **Atividade antimicrobiana de microrganismos probióticos em bebidas lácteas fermentadas**. 2010. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, área de Microbiologia Ambiental, Industrial e de Alimentos) Universidade Estadual Paulista, 2010.

PERSICHETTI, Emanuele, et al. Antioxidative capacity of *Lactobacillus fermentum* LF31 evaluated in vitro by oxygen radical absorbance capacity assay. *Nutrition*, 2014, 30.7: 936-938.

POPRAC, Patrik et al. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. **Trends in pharmacological sciences**, v. 38, n. 7, p. 592-607, 2017.

PUERARI, Cláudia; MAGALHÃES-GUEDES, Karina Teixeira; SCHWAN, Rosane Freitas. Physicochemical and microbiological characterization of chicha, a rice-based fermented beverage produced by Umutina Brazilian Amerindians. *Food microbiology*, 2015, 46: 210-217.

RODRÍGUEZ-NOGALES, Alba, et al. Differential intestinal anti-inflammatory effects of *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus salivarius* in DSS mouse colitis: impact on microRNAs expression and microbiota composition. *Molecular nutrition & food research*, 2017.

SABIA, Carla, et al. Detection and partial characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus fermentum* CS57 isolated from human vaginal secretions. *Anaerobe*, 2014, 26: 41-45.

SANTOS, Eloyza; ANDRADE, Raissa; GOUVEIA, Ester. Utilization of the pectin and pulp of the passion fruit from Caatinga as probiotic food carriers. *Food Bioscience* v.20, p. 56-61,2017.

SANTOS, Eloyza; ANDRADE, Raissa; GOUVEIA, Ester. Utilization of the pectin and pulp of the passion fruit from Caatinga as probiotic food carriers. *Food Bioscience* v.20, p. 56-61,2017.

SUO, Huayi, et al. *Lactobacillus fermentum* suo attenuates HCl/ethanol induced gastric injury in mice through its antioxidant effects. *Nutrientes*, v.8, n.3, p. 155,2016.

TAHMOURESPOUR, Arezoo, et al. The anti-biofouling effect of *Lactobacillus fermentum*-derived biosurfactant against *Streptococcus mutans*. *Biofouling*, 2011, 27.4: 385-392.

VÁZQUEZ-CASTELLANOS, Jorge F., et al. Interplay between gut microbiota metabolism and inflammation in HIV infection, n.0, 2018.

VERCE, Marko; DE VUYST, Luc; WECKX, Stefan. Complete and Annotated Genome Sequence of the Sourdough Lactic Acid Bacterium *Lactobacillus fermentum* IMDO 130101. *Genome announcements*, v. 6, n.19, p. e00256-18, 2018.

VERCE, Marko; DE VUYST, Luc; WECKX, Stefan. Complete and Annotated Genome Sequence of the Sourdough Lactic Acid Bacterium *Lactobacillus fermentum* IMDO 130101. *Genome announcements*, v. 6, n.19, p. e00256-18, 2018.

WANG, A. N., et al. Free radical scavenging activity of *Lactobacillus fermentum* in vitro and its antioxidative effect on growing–finishing pigs. *Journal of applied microbiology*, 2009, 107.4: 1140-1148.

WANNUN, Phirawat; PIWAT, Supatcharin; TEANPAISAN, Rawee. Purification, characterization, and optimum conditions of fermencin SD11, a bacteriocin produced by human orally *Lactobacillus fermentum* SD11. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2016, 179.4: 572-582.

WANNUN, Phirawat; PIWAT, Supatcharin; TEANPAISAN, Rawee. Purification, characterization, and optimum conditions of fermencin SD11, a bacteriocin produced by human orally *Lactobacillus fermentum* SD11. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2016, 179.4: 572-582.

WARDILL, Hannah R., et al. Prophylactic probiotics for cancer therapy-induced diarrhoea: a meta-analysis. **Current opinion in supportive and palliative care**, 2018, 12.2: 187-197.

WEGH, Carrie AM; BENNINGA, Marc A.; TABBERS, Merit M. Effectiveness of Probiotics in Children With Functional Abdominal Pain Disorders and Functional Constipation: A Systematic Review. **Journal of clinical gastroenterology**, 2018.

YADAV, Radha, et al. Consumption of Probiotic Lactobacillus fermentum MTCC: 5898-Fermented Milk Attenuates Dyslipidemia, Oxidative Stress, and Inflammation in Male Rats Fed on Cholesterol-Enriched Diet. **Probiotics and antimicrobial proteins**, p.1-10, 2018.

YADAV, Radha, et al. Consumption of Probiotic Lactobacillus fermentum MTCC: 5898-Fermented Milk Attenuates Dyslipidemia, Oxidative Stress, and Inflammation in Male Rats Fed on Cholesterol-Enriched Diet. **Probiotics and antimicrobial proteins**, p.1-10, 2018.

YADAV, Radha, et al. Consumption of Probiotic Lactobacillus fermentum MTCC: 5898-Fermented Milk Attenuates Dyslipidemia, Oxidative Stress, and Inflammation in Male Rats Fed on Cholesterol-Enriched Diet. **Probiotics and antimicrobial proteins**, p.1-10, 2018.

YEO, Jung-Min, et al. Lactobacillus fermentum CJL-112 protects mice against influenza virus infection by activating T-helper 1 and eliciting a protective immune

YEO, Jung-Min, et al. Lactobacillus fermentum CJL-112 protects mice against influenza virus infection by activating T-helper 1 and eliciting a protective immune

YOUSAF, Sehar, et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of Lactobacillus fermentum, fruit extracts of Syzygium cumini and Momordica charantia on diabetes induced mice. Pak. **J. Pharm. Sci**, 2016, 29.5: 1535-1540.

YOUSAF, Sehar, et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of Lactobacillus fermentum, fruit extracts of Syzygium cumini and Momordica charantia on diabetes induced mice. Pak. **J. Pharm. Sci**, 2016, 29.5: 1535-1540.

YU, Yuanshan, et al. Slight Fermentation with Lactobacillus fermentum Improves the Taste (Sugar: Acid Ratio) of Citrus (Citrus reticulata cv. chachiensis) Juice. **Journal of food science**, 2015, 80.11.

Lactobacillus rhamnosus E O DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS BIOATIVOS

Data de aceite: 10/12/2019

Amanda Caroline de Souza Sales

Universidade CEUMA, Curso de Biomedicina.
São Luís, Maranhão.

Brenda Ferreira de Oliveira

Universidade CEUMA, Curso de Biomedicina.
São Luís, Maranhão.

Deivid Martins Santos

Universidade CEUMA, Curso de Biomedicina.
São Luís, Maranhão.

Mari Silma Maia da Silva

Universidade CEUMA, Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana. São Luís, Maranhão.

Gabrielle Damasceno Evangelista Costa

Universidade CEUMA, Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana. São Luís, Maranhão.

Gustavo Henrique Rodrigues Vale de Macedo

Universidade CEUMA, Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana. São Luís, Maranhão.

Lívia Muritiba Pereira de Lima Coimbra

Universidade CEUMA, Curso de Nutrição e Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (REDE BIONORTE).
São Luís, Maranhão.

Rita de Cássia Mendonça de Miranda

Universidade CEUMA, Programa de Pós-

graduação em Meio Ambiente, Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana e Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (REDE BIONORTE).
São Luís, Maranhão.

Adrielle Zagnignan

Universidade CEUMA, Curso de Nutrição e Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (REDE BIONORTE).
São Luís, Maranhão.

Luís Cláudio Nascimento da Silva

Universidade CEUMA; Curso de Biomedicina, Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana, Programa de Pós-graduação em Odontologia e Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (REDE BIONORTE).
São Luís, Maranhão.

RESUMO: Os probióticos fazem parte dos chamados alimentos funcionais e são definidos como microrganismos vivos não patogênicos que, quando consumidos, podem trazer efeitos benéficos a saúde do hospedeiro, prevenindo ou tratando determinadas doenças, como infecções bacterianas. A inserção de, principalmente, bactérias ácido-láticas em bebidas e alimentos é uma tendência global, e as qualidades funcionais desses produtos vêm sendo cientificamente demonstradas. O presente estudo teve como objetivo discutir o

potencial de isolados de *Lactobacillus rhamnosus* para a obtenção de produtos. *L. rhamnosus* tem sido foco de diversos estudos por prevenir infecções causadas por bactérias patogênicas, além de melhorar a resistência do sistema imune. Diante do potencial terapêutico das cepas de *L. rhamnosus*, diversos produtos fermentados têm sido desenvolvidos e aplicados no combate de doenças, como distúrbios inflamatórios, doenças dermatológicas e doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Bacteriocinas, biosurfactantes e exopolissacarídeos têm sido apontados como os principais responsáveis pelas propriedades farmacêuticas e nutricionais de *L. rhamnosus* (e produtos derivados). Em síntese, os dados de diferentes estudos demonstram que isolados de *L. rhamnosus* são importantes agentes que podem ser explorados no desenvolvimento de novos produtos terapêuticos.

PALAVRAS-CHAVE: Probióticos. Fermentação láctica. Atividade antibacteriana. Estresse oxidativo.

ABSTRACT: Probiotics are part of so-called functional foods and are defined as non-pathogenic living microorganisms that, when consumed, can have beneficial effects on host health by preventing or treating certain diseases, such as bacterial infections. The inclusion of mainly lactic acid bacteria in beverages and foods is a global trend, and the functional qualities of these products have been scientifically demonstrated. The present study aimed to discuss the potential of *Lactobacillus rhamnosus* isolates to obtain products. *L. rhamnosus* has been the focus of several studies for preventing infections caused by pathogenic bacteria, as well as improving the resistance of the immune system. Given the therapeutic potential of *L. rhamnosus* strains, several fermented products have been developed and applied to combat diseases such as inflammatory disorders, dermatological diseases and diseases related to oxidative stress. Bacteriocins, biosurfactants and exopolysaccharides have been pointed as the main responsible for the pharmaceutical and nutritional properties of *L. rhamnosus* (and derived products). In summary, data from different studies show that *L. rhamnosus* isolates are important agents that can be explored in the development of new therapeutic products.

KEYWORDS: Probiotics. Lactic fermentation. Antibacterial activity. Oxidative stress.

1 | INTRODUÇÃO

Probióticos são definidos como microrganismos vivos não patogênicos que, quando consumidos em doses adequadas, proporcionam benefícios à saúde do hospedeiro, atuando na prevenção ou tratamento de determinadas doenças. Como integrante dos alimentos funcionais tem benefícios, como capacidade de sobreviver ao trato gastrointestinal, inibir a proliferação de patógenos e estimular a resposta imune do hospedeiro (DE SOUZA *et al.*, 2018). Segundo Dawood *et al.* (2016), as bactérias ácido-láticas, que fazem parte dos probióticos, possuem um importante papel na formação da microbiota do indivíduo por produzirem substâncias antibacterianas

como ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas, e também por inibirem a proliferação de bactérias prejudiciais ao hospedeiro.

Lactobacillus rhamnosus pertence ao grupo de bactérias ácido-láticas, é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbica facultativa, que produz ácido láctico L(+), acético, fórmico e etanol, em condições de anaerobiose (BERNARDO et al., 2016). São uma das espécies mais estudadas por previnirem doenças infecciosas, como as causadas por *Escherichia coli* (LIU et al., 2016; HE et al., 2017). Além disso, coloniza, acidifica e protege o intestino delgado (PACE, F; PACE, M; QUARTORONE, 2015), alivia reações de hipersensibilidade e inflamação intestinal nos indivíduos com alergias e possuem estabilidade excelente frente à temperatura e níveis reduzidos de pH (FANG et al., 2017; SALIGANTI et al., 2015).

L. rhamnosus inibe o crescimento de bactérias patogênicas, melhorando a resistência do sistema imune, além de conferirem proteção às mucosas através da adesão às membranas, inibindo e prevenindo infecções fúngicas e bacterianas (SALIGANTI et al., 2016). Estudos também mostraram ação na prevenção de diarreia infantil e atividade antitumoral (GAMALLAT et al., 2016). Seu uso é indicado como coadjuvante em casos de neoplasias, eczema, diarreia, intolerância à lactose, inflamação intestinal e infecções dos tratos vaginal e urinário (VAJRO et al., 2011).

A fermentação láctica de produtos alimentícios é uma alternativa interessante e bastante aplicada para a obtenção de produtos diferenciados. Entretanto, apesar deste tipo de fermentação estar muito mais frequentemente associada ao leite, ela também pode ser realizada a partir de outros substratos, como as polpas de frutas, desde que possuam açúcares fermentáveis em suas composições (DI CAGNO et al., 2013).

Vidal et al. (2012), mencionaram que como parte integrante dos alimentos funcionais, os produtos fermentados vêm obtendo popularidade e aceitação devido aos seus benefícios. O uso de frutas apresenta ainda um grande diferencial, a incorporação de aromas e nutrientes específicos, resultando em produtos com características próprias e isentos de lactose, que podem ser bem aceitos pelo consumidor (DI CAGNO et al., 2013). Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo discutir o desenvolvimento de produtos fermentados utilizando *L. rhamnosus*.

2 | CARACTERÍSTICAS GERAIS DO *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS*

Lactobacillus rhamnosus é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbica, heterofermentativa facultativa, ou seja, são microrganismos capazes de fermentar hexoses e pentoses, produzindo os ácidos láctico, acético e fórmico (LI, 2012; MENDES et al., 2011).

Chang e Liew (2013) citaram que esse microrganismo é capaz de combater infecções por *Escherichia coli*, *Salmonella entérica* e *Clostridium*, podendo também inibir o crescimento de uropatógenos em casos de infecções urinárias. LGG é capaz também de reduzir os quadros de diarreia causada tanto por infecção por rotavírus,

quanto pela ingestão de antibióticos (FIGUEROA-GONZÁLES et al., 2011). Ele demonstrou melhor tolerância às condições do trato gastrointestinal, possuindo boa capacidade de aderir e colonizar a mucosa intestinal (LEÃO et al., 2018).

Um estudo recente revelou que essa cepa de *Lactobacillus* foi capaz de permanecer aderida à mucosa intestinal em humanos por mais de uma semana após o fim da sua administração (DE ALMADA et al., 2015). Outro estudo mostrou que a ingestão de *L. rhamnosus* foi capaz de prevenir o desenvolvimento por Candidíase oral em camundongos imunossuprimidos. Os animais que ingeriram o probiótico 14 dias antes da indução da infecção apresentaram menor contagem de leveduras na cavidade oral e nos tecidos. Esses animais também apresentaram níveis reduzidos de IL-6 no soro já que ela é um importante marcador inflamatório. Com isso, sugerem que a ingestão de *L. rhamnosus*, especialmente preventivamente, pode evitar ou diminuir o desenvolvimento de candidíase em camundongos imunossuprimidos (LEÃO et al., 2018).

Ademais, Alanzi et al. (2018) determinaram o efeito de combinações probióticas da cepa *L. rhamnosus* GG (LGG) com *B. lactis* BB-12 sobre a saúde gengival, o acúmulo de placas dentárias e a via oral de quatro patógenos periodontais putativos em adolescentes saudáveis. Participaram do estudo, 108 alunos de 13 a 15 anos de idade. Eles foram divididos em dois grupos: tratados com probióticos (i) e com placebo (ii), ambos os grupos receberam dois comprimidos (probióticos ou placebo) duas vezes ao dia durante um período de quatro semanas. Uma redução significativa foi observada na contagem total de bactérias salivares do grupo teste. Desta forma, o consumo diário de curto prazo de pastilhas probióticas LGG e BB-12 melhorou a saúde gengival em adolescentes e diminuiu as contagens microbianas de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*.

Holowacz et al. (2018) estudaram o potencial do uso oral de probióticos para manejo de doenças dermatológicas, como dermatite atópica. Foram utilizadas cepas de *L. salivarius* LA307, *L. rhamnosus* LA305 e *B. bifidum* PI22 em um modelo de dermatite atópica induzida por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato em camundongos SKH-1. Após o tratamento diário por três semanas com as três cepas foi observado diminuição nos níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-17, IL-22) e um aumento na produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e IL-4). Assim, os autores concluíram que *L. rhamnosus* é um bom candidato para preservar a integridade da pele e a homeostase através da modulação da microbiota intestinal e que seu uso pode ser benéfico em condições dermatológicas como a dermatite atópica.

Em outro estudo foram analisados os efeitos antibacterianos de bacteriocinas obtidas de *L. rhamnosus* ATCC 53103 em um modelo de infecção por *S. aureus* após cirurgia de substituição do joelho de coelhos. As bacteriocinas apresentaram efeitos inibitórios sob a formação de biofilme por *S. aureus* e nos níveis de proteína C reativa (PCR) e IL-6 no soro. Os resultados do presente estudo indicam que as bacteriocinas

são agentes potenciais para a prevenção de infecções pós-operatórias ortopédicas (ZHOU; ZHANG, 2018).

Oh et al. (2018), avaliaram o potencial probiótico e inflamatório de cepas de *L. rhamnosus* isoladas de fezes infantis. A linhagem de *L. rhamnosus* 4B15 apresentou resistência a pH baixo, sais biliares e capacidade de aderir ao intestino. Além disso, a cepa demonstrou outras propriedades funcionais, tais como inibição da atividade da α -glucosidase, redução do colesterol, atividade anti-inflamatória e antioxidante. A ação anti-inflamatória foi demonstrada utilizando macrófagos RAW 264.7 tratados com LPS, onde foi produção de óxido nítrico, liberação de mediadores inflamatórios, como TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-10.

A microbiota intestinal exerce um papel fundamental no desenvolvimento de distúrbios metabólicos. Definir mudanças estruturais nas comunidades microbianas do intestino com condições relacionadas à síndrome metabólica, tem se mostrado difícil. Estudos empregando modelos murinos, compararam dados do DNA genômico 16S e RNA ribossômico da microbiota fecal. O estudo incluiu três grupos de animais experimentais compreendendo dois grupos com obesidade induzida por dieta rica em gordura (DIO), enquanto um terceiro grupo (controle) recebeu uma dieta com baixo teor de gordura. Um dos grupos DIO foi tratado com o probiótico *L. rhamnosus* GG (LGG). Em comparação com os dados obtidos pela análise de DNA, uma abundância significativamente maior de OTUs foi contabilizada pela análise de RNA. Com isso a análise baseada em rRNA mostrou uma modulação da população microbiana intestinal ativa no grupo DIO que recebeu LGG, analisando uma mudança no estado de obesidade induzida do hospedeiro. Assim, a funcionalidade do *L. rhamnosus* GG tem sido associada a atenuação da síndrome metabólica e, em alguns casos, a um impacto no microbioma resultando no consumo de calorias que afeta o ganho de peso concomitantemente com a modulação da estrutura funcional da população microbiana do intestino (JI et al., 2018).

3 | PRINCIPAIS COMPOSTOS BIOATIVOS PRODUZIDOS POR *L. RHAMNOSUS*

Os biossurfactantes (BS) são compostos anfifílicos produzidos por *L. rhamnosus* que apresentam propriedades antimicrobianas e anti-adesivas, tornando-os bons candidatos para aplicações no combate a infecções. O principal objetivo é avaliar as capacidades antimicrobiana, anti-adesivas e anti-biofilme *in vitro* da BS produzida por *Lactobacillus jensenii* e *L. rhamnosus* contra cepas clínicas Resistentes a Múltiplos Medicamentos (MDR) de *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (SAMBANTHAMOORTHY et al., 2014).

Em um recente trabalho, foram comparadas as habilidades dos polissacarídeos L900/2 e L300/3 isolados de *L. rhamnosus* LOCK 0900, para modular a resposta imune a antígenos espectadores em um modelo de camundongo de sensibilização de ovalbumina (OVA), onde ambos os polissacarídeos estimularam respostas celulares

com propriedades distintas onde suprimiu significativamente as regularidades aumentadas induzidas por OVA de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (GÓRSKA et al., 2017).

4 | *L. RHAMNOSUS* E AÇÃO ANTIOXIDANTE

Em um recente estudo investigaram-se as propriedades antioxidantes das cepas de *L. rhamnosus*, onde foram encontrados um alto teor de compostos voltados à eliminação de radicais livres e inibição da peroxidação de ácido linoleico, superóxido dismutase e glutatona. Resultados mostraram uma ampla série de propriedades antioxidantes que indicam que essas propriedades são específicas da linhagem, onde foi observado também que *L. rhamnosus* com alto teor de substâncias antioxidantes poderiam tolerar bem o estresse oxidativo (CHLOORUK; PIWAT; TEANPAISAN, 2017).

Tsai et al. (2013) observaram a atividade antioxidante, além de propriedades de retenção de umidade do sobrenadante de cultura de *L. rhamnosus* (Lr- SCS) em aplicações cosméticas, no qual resultados revelaram que Lr- SCS elimina de forma eficaz e gradual os radicais 1,1-difenil-2-picrilhidrazil e 2,2-azino-bis- (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico), e aumenta o poder redutor numa dose forma dependente. Desse modo, promovendo efetivamente a retenção da umidade e promovendo a atividade da tirosina in vitro.

Sharma et al. (2014), determinaram o potencial anti-imunossenescência do leite fermentado com *L. rhamnosus* probióticos em camundongos envelhecidos, melhorando no desequilíbrio Th1/Th2 associado à imunossenescência, a capacidade antioxidante e aumentando a resistência de camundongos à infecção por *E. coli* aumentando seu potencial para um envelhecimento saudável.

Verma e Shukla (2014) realizaram um estudo no qual o objetivo foi delinear os efeitos antioxidantes e antitumorigênicos dos simbióticos (*L. rhamnosus* + *L. acidophilus* + inulina) na carcinogênese experimental do cólon. Observou-se que a administração de um simbiótico, antes da carcinogênese do cólon induzida pelo dicloridrato de 1,2-dimetil-hidrazina (DMH) em ratos Sprague-Dawley, levou ao aumento do peso corporal e da taxa de crescimento e diminuiu a incidência de tumores em comparação com o grupo tratado apenas com DMH. O estudo mostra que o uso de simbióticos é uma estratégia profilática melhor do que o uso de probiótico e prebiótico sozinho devido ao maior aumento de antioxidantes associado ao maior grau de atenuação da tumorgênese induzida por DMH.

Em um recente estudo observou-se que *L. rhamnosus* GG antagoniza o estresse oxidativo induzido por *Giardia intestinalis* e dissacarídeses intestinais em camundongos BALB, mostrando que os camundongos infectados com *G. intestinalis* e que foram alimentados com probióticos aumentaram significativamente os níveis de antioxidantes [glutatona reduzida (GSH) e superóxido dismutase (SOD)] e dissacarídeses intestinais (sacarase e lactase), e diminuição dos níveis de oxidantes no intestino delgado. Assim, os efeitos de *L. rhamnosus* GG podem ser usados como uma alternativa de terapia de

interferência microbiana, pois suas propriedades antioxidantes na lesão tecidual são plausíveis (GOYAL; RISHI; SHUKLA, 2013).

5 | DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS FERMENTADOS COM *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS*

Diante do potencial terapêutico das cepas de *L. rhamnosus*, diversos produtos fermentados têm sido desenvolvidos e aplicados no combate de doenças, como distúrbios inflamatórios, doenças dermatológicas e doenças relacionadas ao estresse oxidativo (BERBL et al., 2016).

Rungsri et al. (2017) avaliaram o efeito do leite fermentado contendo *L. rhamnosus* SD11 na microbiota oral. Foram recrutados 43 jovens saudáveis que foram aleatoriamente designados em dois grupos que receberam leite fermentado com *L. rhamnosus* SD11 ou *L. bulgaricus*, uma vez ao dia por 4 semanas. Os resultados demonstraram que houve reduções estatisticamente significativas no número de estreptococos do grupo mutans nos indivíduos que receberam leites com *L. rhamnosus* SD11 que pode ser detectado (em > 80% dos indivíduos) até 4 semanas após a interrupção da dosagem entre os indivíduos do grupo probiótico. Não foram relatados efeitos colaterais. Assim, *L. rhamnosus* SD11 pode ser usado como uma cultura inicial para o leite fermentado.

Segundo Kemgang et al. (2016), o leite fermentado com probiótico *L. rhamnosus* S1K3 (MTCC5957) protegeu camundongos de infecções por *Salmonella*, melhorando os mecanismos de proteção imunológica e não imune a nível de mucosa intestinal. Foi avaliado o mecanismo pelo qual o probiótico *L. rhamnosus* S1K3 poderia superar a cepa patogênica *Salmonella* enterica com ênfase na resposta no nível da mucosa intestinal após longo prazo (30 dias) de consumo. O S1K3 foi capaz de produzir compostos antimicrobianos contra os patógenos aderindo fortemente ao epitélio intestinal e mantendo a sua integridade na presença de *Salmonella* através da estimulação e da junção apertadas de gene peptídicos antimicrobianos in vitro. Após o tratamento por 30 dias com leite fermentado S1K3, os camundongos apresentaram baixa incidência de *Salmonella* patogênica nas mucosas e a nível sistêmico, seguidos por um aumento na secreção de IgA no fluido intestinal e no soro. Além disso, S1K3 manteve os níveis de IL-12, aumentou IL-4 e reduziu o nível de TGF- β no fluido intestinal / soro na fase tardia da infecção. Tendo em vista o desempenho, o S1K3 pode ser um candidato adequado para o desenvolvimento de alimentos nutracêuticos.

Recentemente, foi realizado um estudo onde se investigou também a melhoria de atividades anti-inflamatórias intestinais da caseína do leite glicado após a fermentação com *L. rhamnosus* 4B15. A avaliação glicoproteômica de caseína de leite glicada (GMC) e GMC fermentada por *L. rhamnosus* 4B15 (FGMC) demonstrou que houve aumento significativo nas atividades antioxidante e anti-inflamatória do GMC com galactose, que foram superiores às do GMC com glicose (GMC-glc), onde a fermentação de GMC

por *L. rhamnosus* 4B15 aumentou sinergicamente as atividades acima, comparadas com as do GMC não fermentado (OH et al., 2017).

6 | CONCLUSÃO

Devido à tendência global de utilização de alimentos funcionais e a necessidade da indústria alimentícia de desenvolver produtos inovadores, *Lactobacillus rhamnosus* emerge como grande promissor, por apresentar elevada aplicabilidade em produtos fermentados.

Sendo assim, a prospecção de novos compostos bioativos utilizando cepas de *L. rhamnosus* tem se mostrado bastante eficaz, visto que diversos ensaios vêm demonstrando comprovadas atividades profilática e terapêutica por meio deste microrganismo.

REFERÊNCIAS

- ALANZI, A. et al. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* and Bifidobacterium lactis on gingival health, dental plaque, and periodontopathogens in adolescents: a randomised placebo-controlled clinical trial. **Beneficial microbes**, p. 1-10, 2018.
- BERNARDO, Marcela Piassi et al. L-(+)-Lactic acid production by *Lactobacillus rhamnosus* B103 from dairy industry waste. **brazilian journal of microbiology**, v. 47, n. 3, p. 640-646, 2016.
- BERBL, Camyle Zavatto et al. PROBIOTICS IN THE TREATMENT OF ATOPIC DERMATITIS AND ACNE. **Visão Acadêmica**, v. 17, n. 2, 2016.
- CHANG, C. P.; LIEW, Siew Ling. Growth medium optimization for biomass production of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. **Journal of Food Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 536-543, 2013.
- CHLOORUK, Aksorntong; PIWAT, Supatcharin; TEANPAISAN, Rawee. Antioxidant activity of various oral Lactobacillus strains. **Journal of applied microbiology**, 2017.
- DAWOOD, Mahmoud AO et al. Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus rhamnosus* or/and Lactococcus lactis on the growth, gut microbiota and immune responses of red sea bream, *Pagrus major*. **Fish & shellfish immunology**, v. 49, p. 275-285, 2016.
- DE ALMADA, Carine Nunes et al. Characterization of the intestinal microbiota and its interaction with probiotics and health impacts. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 10, p. 4175-4199, 2015.
- DE SOUZA, Evandro Leite et al. Potential interactions among phenolic compounds and probiotics for mutual boosting of their health-promoting properties and food functionalities—A review. **Critical reviews in food science and nutrition**, p. 1-15, 2018.
- DI CAGNO, Raffaella et al. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. **Food Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 1-10, 2013.
- FANG, S. et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG improves symptoms and its mechanism in mice with ovalbumin-induced food allergy. **Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi= Chinese journal of cellular and molecular immunology**, v. 33, n. 5, p. 597-600, 2017.

- FIGUEROA-GONZÁLEZ, Ivonne et al. Probiotics and prebiotics—perspectives and challenges. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 8, p. 1341-1348, 2011.
- GAMALLAT, Yaser et al. *Lactobacillus rhamnosus* induced epithelial cell apoptosis, ameliorates inflammation and prevents colon cancer development in an animal model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 83, p. 536-541, 2016.
- GÓRSKA, Sabina et al. Polysaccharides L900/2 and L900/3 isolated from *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900 modulate allergic sensitization to ovalbumin in a mouse model. **Microbial biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 586-593, 2017.
- GOYAL, Nisha; RISHI, Praveen; SHUKLA, Geeta. *Lactobacillus rhamnosus* GG antagonizes *Giardia intestinalis* induced oxidative stress and intestinal disaccharidases: an experimental study. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 6, p. 1049-1057, 2013.
- HE, Xiaolong et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG supernatant enhance neonatal resistance to systemic *Escherichia coli* K1 infection by accelerating development of intestinal defense. **Scientific reports**, v. 7, p. 43305, 2017.
- HOLLOWACZ, S. et al. *Lactobacillus salivarius* LA307 and *Lactobacillus rhamnosus* LA305 attenuate skin inflammation in mice. **Beneficial microbes**, v. 9, n. 2, p. 299-309, 2018.
- Jl, Yosep et al. Modulation of Active Gut Microbiota by *Lactobacillus rhamnosus* GG in a Diet Induced Obesity Murine Model. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 710, 2018.
- KEMGANG, Tanedjeu Sonfack et al. Fermented milk with probiotic *Lactobacillus rhamnosus* S1K3 (MTCC5957) protects mice from salmonella by enhancing immune and nonimmune protection mechanisms at intestinal mucosal level. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 30, p. 62-73, 2016.
- LEÃO, Mariella Vieira Pereira et al. *Lactobacillus rhamnosus* intake can prevent the development of Candidiasis. **Clinical oral investigations**, p. 1-8, 2018.
- LI, Guijie. Intestinal probiotics: interactions with bile salts and reduction of cholesterol. **Procedia Environmental Sciences**, v. 12, p. 1180-1186, 2012.
- LIU, Mingchao et al. *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 limits *Escherichia coli*-Induced inflammatory responses via attenuating MyD88-Dependent and MyD88-Independent pathway activation in bovine endometrial epithelial cells. **Inflammation**, v. 39, n. 4, p. 1483-1494, 2016.
- MENDES, D. P. G. **Características Físico-Químicas e Microbiológicas e Aceitação Sensorial de Leites Fermentados por Bactérias Produtoras de Ácido Lático Isoladas de Queijo Coalho de Pernambuco** – Dissertação de Mestrado. Belo Horizonte, MG: UFMG. 2011. 63p.
- OH, Nam Su et al. Enhancement of Antioxidative and Intestinal Anti-inflammatory Activities of Glycated Milk Casein after Fermentation with *Lactobacillus rhamnosus* 4B15. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 65, n. 23, p. 4744-4754, 2017.
- OH, Nam Su et al. Probiotic and anti-inflammatory potential of *Lactobacillus rhamnosus* 4B15 and *Lactobacillus gasseri* 4M13 isolated from infant feces. **PloS one**, v. 13, n. 2, p. e0192021, 2018.
- PACE, F.; PACE, M.; QUARTARONE, G. Probiotics in digestive diseases: focus on *Lactobacillus* GG. **Minerva gastroenterologica e dietologica**, v. 61, n. 4, p. 273-292, 2015.
- RUNGSRI, P. et al. Effect of fermented milk containing *Lactobacillus rhamnosus* SD11 on oral microbiota of healthy volunteers: A randomized clinical trial. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 10, p. 7780-7787, 2017.

SALIGANTI, Vamshi et al. Feeding probiotic *Lactobacillus rhamnosus* (MTCC 5897) fermented milk to suckling mothers alleviates ovalbumin-induced allergic sensitisation in mice offspring. **British Journal of Nutrition**, v. 114, n. 8, p. 1168-1179, 2015.

SALIGANTI, Vamshi; KAPILA, Rajeev; KAPILA, Suman. Consumption of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* (MTCC: 5897) containing fermented milk plays a key role in development of the immune system in newborn mice during the suckling–weaning transition. **Microbiology and immunology**, v. 60, n. 4, p. 261-267, 2016.

SAMBANTHAMOORTHY, Karthik et al. Antimicrobial and antibiofilm potential of biosurfactants isolated from lactobacilli against multi-drug-resistant pathogens. **BMC microbiology**, v. 14, n. 1, p. 197, 2014.

SHARMA, Rohit et al. Improvement in Th1/Th2 immune homeostasis, antioxidative status and resistance to pathogenic *E. coli* on consumption of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* fermented milk in aging mice. **Age**, v. 36, n. 4, p. 9686, 2014.

TSAI, Cheng-Chih et al. Applications of *Lactobacillus rhamnosus* spent culture supernatant in cosmetic antioxidation, whitening and moisture retention applications. **Molecules**, v. 18, n. 11, p. 14161-14171, 2013.

VAJRO, P; et al. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in pediatric obesity-related liver disease. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.**, vol.56, n.6, p.740-743, 2011.

VERMA, Angela; SHUKLA, Geeta. Synbiotic (*Lactobacillus rhamnosus*+ *Lactobacillus acidophilus*+ inulin) attenuates oxidative stress and colonic damage in 1, 2 dimethylhydrazine dihydrochloride-induced colon carcinogenesis in Sprague–Dawley rats: a long-term study. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 23, n. 6, p. 550-559, 2014.

VIDAL, Andressa Meirelles et al. A ingestão de alimentos funcionais e sua contribuição para a diminuição da incidência de doenças. **Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT**, v. 1, n. 1, p. 43-52, 2012.

XING, Jiali et al. Determining antioxidant activities of lactobacilli cell-free supernatants by cellular antioxidant assay: a comparison with traditional methods. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0119058, 2015.

MULTIPLEX PCR FOR THE DETECTION OF DIARRHEAGENIC *Escherichia coli* PATHOTYPES IN CHILDREN WITH ACUTE DIARRHEA

Data de submissão: 19/11/2019

Data de aceite: 10/12/2019

Daniela Cristiane da Cruz Rocha

Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,
Pará, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/4294679098531496>

Anderson Nonato do Rosario Marinho

Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,
Pará, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/1184866913213283>

Karina Lúcia Silva da Silva

Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,
Pará, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/4308364152963260>

Edvaldo Carlos Brito Loureiro

Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,
Pará, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/2685418720563351>

Eveline Bezerra Sousa

Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,
Pará, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/3387101084207778>

Corresponding address: Daniela Cristiane da Cruz Rocha. Instituto Evandro Chagas, Rodovia BR 316, km 07, s/n, Bairro Levilândia. CEP: 69.030-000. Ananindeua-PA Phone: 55 (091) 3214-2297. E-mail: danielarocha@iec.gov.br/danielaufpa@yahoo.com.br

ABSTRACT: Gastrointestinal tract diseases have a global distribution, affecting mainly children. In developing countries, they are important cause of morbidity and mortality, considering the bacterial etiology. Enterobacteria, as pathogenic *Escherichia coli*, are recognized as important etiology agents, being closely linked to endemic forms of childhood diarrhea. The objective of this work was to isolate and characterize *E. coli* pathotypes from fecal samples culture from diarrhea patients and healthy people (control group) attended at Public Health Units. 239 fecal samples were evaluated (152 diarrhea and 87 controls). For the isolation of enteropathogenic bacteria, we used selective indicator and enrichment media. Biochemical characterization was performed using API-20E Systems and serological through polyvalent and monovalent antisera. For the detection of pathogenic categories of *E. coli* (EPEC-enteropathogenic *E. coli*, ETEC-enterotoxigenic *E. coli*, STEC-Shiga toxin producer *E. coli*, EIEC-enteroinvader *E. coli* and EAEC-enteroaggregative *E. coli*) multiplex PCR assays (M-PCR) were performed using specific primers for each virulence factor. As for the pathogenic categories of *E. coli*, ETEC 7.2% (12/152) was the most common pathotype in cases of diarrhea followed by EAEC 5.9% (9/152), while in controls, the highest proportion 9.2% (8/87) was represented by EAEC followed

by EPEC 2.3% (2/87). Of the eight enteropathogenic *E. coli* (EPEC) identified, only one was typical EPEC and of the twelve enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) isolates, five presented the ST-coding genes, four from LT and ST and three from LT. The multiplex PCR assays was therefore showed as important tools in the rapid identification of pathogenic *E. coli* categories, and can be routinely used in the molecular diagnosis of these categories.

KEYWORDS: Pathogenic *Escherichia coli*, diarrhea; Multiplex PCR.

PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DOS PATOTIPOS DE *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICAS EM CRIANÇAS COM DIARREIA AGUDA

RESUMO: Doenças do trato gastrointestinal têm uma distribuição global, afetando principalmente crianças. Nos países em desenvolvimento, figuram como importante causa de morbimortalidade, considerando-se a etiologia bacteriana. Enterobactérias, como as *Escherichia coli* patogênicas, são reconhecidas como importantes agentes etiológicos estando estreitamente ligadas as formas endêmicas de diarreia infantil. O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar patotipos de *E. coli* a partir de culturas de amostras fecais de pacientes com diarreia atendidos em Unidades de Saúde Pública e de pessoas saudáveis (grupo controle). Foram avaliadas 239 amostras de fezes (152 diarréicas e 87 controles). Para o isolamento de bactérias enteropatogênicas, utilizou-se meios seletivos indicadores e de enriquecimento. A caracterização bioquímica foi realizada utilizando os Sistemas API-20E e a sorológica, através de antissoros polivalentes e monovalentes. Para a detecção das categorias patogênicas de *E. coli* (EPEC- *E. coli* enteropatogênica, ETEC- *E. coli* enterotoxigênica, STEC- *E. coli* produtora de toxina de Shiga, EIEC- *E. coli* enteroinvasora e EAEC-*E. coli* enteroagregativa) foram executados ensaios de PCR Multiplex (M-PCR) utilizando-se primers específicos para cada fator de virulência. Quanto às categorias patogênicas de *E. coli*, a ETEC 7,2% (12/152) foi o patotipo mais frequente nos casos de diarreia aguda, seguido de EAEC 5,9% (9/152), enquanto nos controles, a maior proporção 9,2% (8/87) foi representada pela EAEC seguido de EPEC 2,3% (2/87). Das oito *E. coli* enteropatogênicas (EPEC) identificadas, apenas uma foi EPEC típica e das doze *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) isoladas, cinco apresentaram os genes codificadores de ST, quatro de LT e ST e três de LT. Os ensaios da PCR multiplex mostraram-se, portanto uma ferramenta importante na identificação rápida das categorias de *E. coli* patogênicas, podendo ser utilizados rotineiramente no diagnóstico molecular dessas categorias.

PALAVRAS-CHAVE: *Escherichia coli* patogênica, diarreia; PCR Multiplex.

1 | INTRODUCTION

Diarrheal diseases are an important public health problem, being one of the most important causes of mortality and morbidity among children under five years old, mostly in developing countries, and with predisposing factors as early breastfeeding

abandonment, low educational level and unsatisfactory sanitary hygienic conditions (Fiedoruk et al, 2015). In Brazil, the regions with the highest occurrence of these diseases are the North and Northeast, as they concentrate the poorest populations in the country (Bühler et al., 2014).

A wide variety of pathogens (viruses, bacteria and protozoa) are implicated in the genesis of diarrheal disease, presenting higher prevalence and importance in childhood, especially rotavirus (Lanata et al., 2013). Regarding bacterial etiology, *E. coli* is considered to be the pathogen most often related to endemic forms of acute diarrhea in children (Bonkougou et al., 2013). In addition to enteropathogenic *E. coli* (EPEC) related to intestinal infections, other categories of *E. coli* are involved such as enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Shiga toxin producer *E. coli* (STEC), enteroinvader *E. coli* (EIEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC) and diffusely adhering *E. coli* (DAEC) (Nejma et al., 2014).

Enteropathogenic *E. coli* is divided into two categories, typical EPEC: presents *eaeA* gene and plasmid EAF and atypical EPEC: presents only *eaeA* gene. Typical EPEC is well recognized as a major cause of childhood gastroenteritis; on the other hand, the role of atypical EPEC in childhood diarrhea remains controversial. However, many studies have shown some significant association between atypical EPEC and diarrhea. STEC induced diarrheal manifestations are attributed to two enterotoxins, called SLT-I and SLT-II (Shiga Like Toxin), also known as Verotoxins (VT-1 and VT-2) and Shiga toxin (Stx-1 and Stx-2) (Croxen et al., 2013).

The mechanism which ETEC promotes diarrhea is well known: adherence in the intestinal mucosa and elaboration of enterotoxins. Adherence to the intestinal mucosa is related to adhesins known as Pili type 1 and CFA I and II (colonization factors). From the colonization begins the elaboration of enterotoxins. ETEC strains produce two types of enterotoxins: thermolabile toxins LT - I and LT - II (heat-labile toxin) and thermostable toxins STa and STb (heat-stable toxin) (Dubreuil; Isaacson; Schifferli, 2016).

The typical disease caused by EAEC is characterized by secretory, mucoid and watery diarrhea and in some cases has little or no symptoms such as vomiting and low fever. The most studied virulence factor is *aggR*, the main regulator of EAEC virulence gene, which controls the expression of adhesion factors, dispersin protein, and a set of genes encoded by the EAEC chromosome. However, the frequency of these pathogens is underestimated because its detection requires more sensitive and specific diagnostic methods that are not used in clinical practice, which restricts the use of efficient ways for epidemiological control and prevention (Croxen et al., 2013).

The diagnosis of DEC is made difficult by the fact that these organisms cannot be identified based only on biochemical criteria since they are generally indistinguishable from non-pathogenic *E. coli*. Differentiation between *E. coli* pathotypes requires the use of immunoassays, cell culture or molecular techniques (Croxen et al., 2013).

In molecular assays using the PCR technique it is possible to detect genes involved with the pathogenicity of several bacterial isolates, allowing rapid identification

with accurate results since this technique has high sensitivity and specificity (Wang et al ,2014). In this way, the present study used the multiplex PCR methodology to evaluate the applicability of this assay to determine the diarrheagenic E. coli categories isolated from individuals with and without diarrhea.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 SAMPLING

From February and June 2008 to July 2009, 850 isolated samples from 239 individuals (152 diarrheics-three or more evacuations/ day and 87 controls-absence of diarrhea in the last 15 days) were evaluated for virulence factors. of the E. coli diarrheagenic categories, from different age groups (54.4% were under 10 years old) and sex attended at three health units and a public hospital in the county of Juruti, State of Pará.

The study was approved by the Human Research Ethics Committee of the Evandro Chagas Institute, SVS / MS, under Protocol CEP/IEC-No. 0013/2009, CAAE No. 0016.0.072.000-09, of August 27, 2009.

2.2 DIARRHEAGENIC E. coli MOLECULAR RESEARCH

E. coli samples previously stored on Luria agar (Difco) were biochemically reidentified and then cultured on nutrient agar (Difco) at 35 - 37 ° C for 18 - 24 hours. The reference strains used as positive controls were Escherichia coli: EPEC E2348 / 69 (eae and bfpA gene), EAEC O42 (aggR gene), ETEC H10407 (elt and est gene), EIEC EDL1284 (ipaH gene) and EHEC EDL931 (stx gene) and Escherichia coli K12 DH5α as negative control. All of them were kindly provided by Dr. Tânia Vaz of the Adolfo Lutz Institute/SP.

2.2.1 Bacterial DNA Extraction and Primer Selection

The DNA from the phenotypically characterized isolates as E. coli and from the reference strains of the positive and negative controls was extracted by boiling and freezing method, following the recommendations of Starnbach et al. (1989) e Baloda et al (1995). Different oligonucleotide sequences were selected based on the work developed by Aranda et al. (2007) (Table 1).

Designation	Oligonucleotides sequence (5´ - 3´)	Target gene	Amplification products	References
eae-1 eae-2	CTGAACGGCGATTACGCGAA CGAGACGATACGATCCAG	eae	917 pb	Aranda et al. (2004)
BFP-1 BFP-2	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	bfpA	326 pb	Aranda et al. (2004)
aggRks-1 aggRksa-2	GTATACACAAAAGAAGGAAGC ACAGAATCGTCAGCATCAGC	aggR	254 pb	Toma et al. (2003)

LT-f	GGCGACAGATTATACCGTGC	elt	450 pb	Aranda et al. (2004)
LT-r	CGGTCTCTATATCCCTGTT			
ST-f	ATTTTTMTTCTGATTTTCTT	est	190 pb	Aranda et al. (2004)
ST-r	CACCCGGTACARGCAGGATT			
IpaH-1	GTTCCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC	ipaH	600 pb	Aranda et al. (2004)
IpaH-2	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC			
VTcom-u	GAGCGAAATAATTTATATGTG	stx1/ stx2	518 pb	Toma et al. (2003)
VTcom-d	TGATGATGGCAATTCAGTAT			

Table 1 - Oligonucleotides used in multiplex PCR and their respective amplification products.

2.2.2 Multiplex PCR

The PCR reaction was performed from 2 μ L of each extracted DNA and 23 μ L of the mix solution, containing between 0.5 to 1.5 μ L according to each primer (Invitrogen, Brazil), 10 mM dNTP mix dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Invitrogen, Brazil, Invitrogen, USA), 0.5 U Taq DNA Platinum Polymerase, Taq 1X Buffer, 50 mM MgCl₂ (Invitrogen, Brazil) and ultra pure sterile water to a final volume of 25 μ L. The multiplex PCR preparations were placed on the Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems - USA) automatic gradient thermal cycler model and subjected to specific amplification cycles consisting of 1 2 min step at 50 °C (Hot-Start), 1 step 5 min. at 95 °C (Initial Denaturation) followed by 40 cycles of 1 s at 95 °C, 50 °C and 72 °C and 1 final extension step of 7 min at 72 °C.

Amplicons were analyzed by electrophoresis on 2% agarose gel, stained with ethidium bromide (10 mg / mL) in TBE buffer (0.89M Tris base, 0.45M Boric Acid, 1mM EDTA, pH 8.4) and visualized under UV light with the aid of a transilluminator (Vilber Lourmat, France). As molecular size marker was used the 1 Kb plus-Invitrogen Ladder, Brazil. Subsequently, the gel was photographed by a photodocumentation system, Biomaging Systems (UPV, U.S.A).

3 | RESULTS

The results obtained by multiplex PCR were able to reproduce the results generated by the PCR protocols developed by Aranda et al. (2007) highlighting the cost savings due to the use of a more affordable Taq DNA polymerase. We identified 39 diarrheagenic *E. coli* isolates (17 EAEC, 12 ETEC, 8 EPEC, 1 EIEC and 1 STEC), distributed among patients with acute diarrhea with 17.8% (27/152) and 13, 9% in the control group (12/87) (Table 1). There was no statistically significant difference between the diarrheagenic *E. coli* distribution in the diarrheal and control groups ($p = 0.5340$); on the other hand, the frequency of pathogenic *E. coli* categories was statistically different between them ($p < 0.0001$). The largest number of positive samples was observed in the age group of 1-9 years old, followed by 20-29 years.

In the multiplex PCR assay all seven molecular targets were amplified (Figure 1). Enterotoxigenic *E. coli* was the most frequent (7.2%) in patients with acute diarrhea,

while in controls, the highest proportion (9.2%) was represented by enteroaggregative *E. coli* (Table 1). However, none of the diarrheagenic *E. coli* categories were associated with the diarrheal group (Table 2).

Of the 24 positive samples, diarrheagenic *E. coli* infections were unique: 10 ETEC, 8 EAEC, 5 EPEC and 1 STEC. Of the 8 enteropathogenic *E. coli* positive samples, 7 were atypical EPECs and 12 of the enterotoxigenic *E. coli* isolates, 5 had ST, 4 LT and ST and 3 LT coding genes.

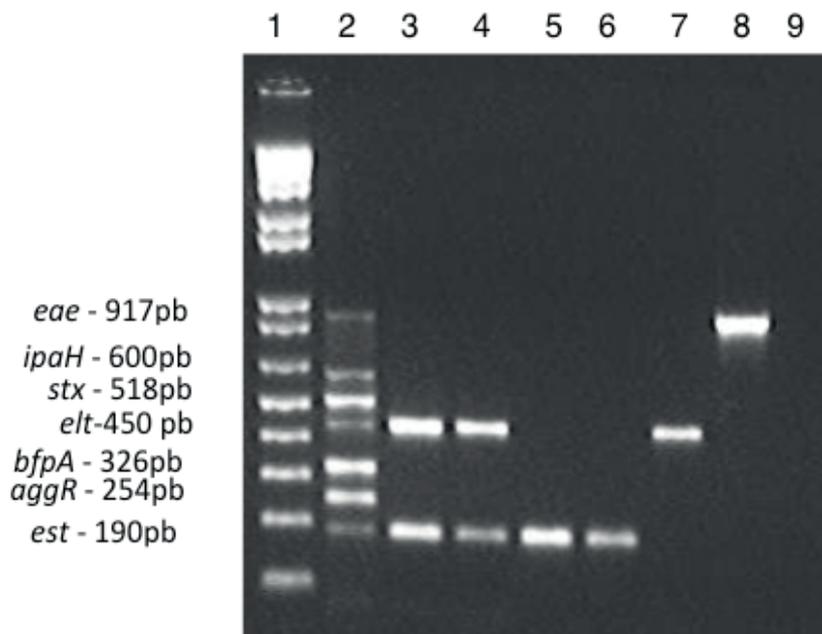


Figure 1 - Multiplex PCR assay, 1 - Ladder 1Kb, 2 - positive control (mix of the 5 standard diarrheagenic *E. coli* categories). Clinical samples: 3 and 4 - ETEC (elt, est), 5 and 6 - ETEC (est), 7 - ETEC (elt), 8 - EPEC (eae) and 9 - negative control (*E. coli* K12 DH5α).

Diarrheagenic <i>E. coli</i>	Group					Total (NP/NA)	(p)
	Diarrheal		Control		%		
	%	(NP/NA)	%	(NP/NA)	%		
EAEC	5,9	(9/152)	9,2	(8/87)	7,1	(17/239)	0,4977
ETEC	7,2	(11/152)	1,2	(1/87)	5,0	(12/239)	0,0561
EPEC	4,0	(6/152)	2,3	(2/87)	3,3	(8/239)	0,7555
EIEC	0,7	(1/152)	-	(0/87)	0,4	(1/239)	0,7812
STEC	-	(0/152)	1,2	(1/87)	0,4	(1/239)	0,7812
Total	17,8	(27/152)	13,9	(12/87)	16,2	(39/239)	

Table 2 - Distribution of diarrheagenic *Escherichia coli* categories isolated from individuals in the diarrheal and control group, Juruti, Pará. February and June 2008 to July 2009.

* NP / NA: Number of positive samples/number of samples evaluated.

To demonstrate the effectiveness of the used multiplex PCR assays, we compared the results obtained from the 39 diarrheagenic *E. coli* samples identified with 39 non-diarrheagenic samples, both detected using the multiplex and monoplex PCR protocol, respectively. Figure 2 shows the amplification products and molecular sizes of the

pathogenic *E. coli* virulence factor gene fragments of the reference strains and one representative of the clinical sample for each target searched. Table 3 shows the full agreement on multiplex and monoplex PCR results, demonstrating positive results for diarrheagenic *E. coli* and negative for non-diarrheagenic *E. coli*.



Figure 2 - Electrophoresis of conventional PCR products. 1kb ladder (1 and 16); EPEC E2348/69 - eae and bfpA (2 and 4); EPEC - eae and bfpA (3 and 5); EAEC O42 - aggR (6), EAEC (7); ETEC H10407 - elt and est (8 and 10), ETEC - elt and est (9 and 11); EIEC EDL1284 - ipaH (12), EIEC - (13); STEC EDL931 - stx1/stx2 (14) and STEC - stx1/stx2 (15).

<i>Diarrheagenic Escherichia coli</i>	Numbe of samples	Targets	Multiplex	Monoplex
Typical EPEC	1	eae, bfpA	1	1
Atypical EPEC	7	eae	7	7
ETEC	3	elt	3	3
	5	est	5	5
	4	elt, est	4	4
EAEC	17	aggR	17	17
EIEC	1	ipaH	1	1
STEC	1	stx-1/ srx-2	1	1
E. coli	39		39	39

Table 3 - Comparison of positive results obtained by multiplex and monoplex PCR.

4 | DISCUSSION

Diarrheagenic *Escherichia coli* are recognized as emerging etiology pathogen, as a cause of childhood diarrhea, especially in developing countries, and the epidemiological significance of each type of pathogenic *E. coli* in childhood diarrhea varies greatly with geographic area (Nguyen et al., 2006; Paniagua et al., 2007). The proportion of isolated diarrheagenic *Escherichia coli* in the diarrheal group was 12.8% (27-118) versus 5.7% (12-36) in the control group. Of the 39 pathogenic *E. coli* pathotypes isolated, 25 were present in children under 10 years of age. These data are similar to those observed by Nguyen et al. (2006) and Samal et al. (2008).

In patients with acute diarrhea, ETEC (7.2%) had the highest frequency, followed by EAEC (5.9%) and EPEC (4%). However, these *E. coli* pathotypes were not statistically associated with the diarrheal group, corroborating the findings of Bueris et al. (2007), where the prevalence of *E. coli* types identified in Bahia were not significantly different between individuals in the diarrheal and control group. However, these findings differed from most studies that the frequency of diarrheagenic *E. coli* in patients with acute diarrhea is higher compared to those without diarrhea (Nguyen et al., 2005; Rappelli et al., 2005; Orlandi et al., 2006; Paniagua et al., 2007; Hien et al., 2007).

In Mexico and other developing countries, ETEC is the most prevalent category of diarrheagenic *E. coli*. This bacteria is considered a major pathogen of childhood diarrhea, especially during the first 6 months of life, where isolation rates range from 10 to 30% and is also responsible for most episodes of gastroenteritis among travelers (Nguyen et al., 2006; Paniagua et al., 2007). In this study, the presence of ETEC in the diarrheal group was 7.2% and 1.2% in the control group. This finding was similar to that found by Nguyen et al. (2006). However in most studies, ETEC is strongly associated with patients in the diarrheal group (Haque et al., 2003; Rappelli et al., 2005; Hien et al., 2007; Paniagua et al., 2007; Al-Gallas et al. al., 2007).

Of the twelve enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) isolated: five were positive for the ST toxin gene, four for both LT and ST toxin genes and three for LT. Diversity in ETEC strains can be observed in different studies in the literature that address molecular and epidemiological investigations. Among these studies, the question remains if the amount of gallbladder-linked LT is sufficient to induce ETEC diarrhea (Sánchez and Holmgren, 2005). A study done in Japan where PCR stool samples from people with symptoms such as diarrhea, fever and abdominal pain were found to have only the ST toxin genes (Tsuji et al., 2002).

In the present study, a low frequency of enteropathogenic *E. coli* was found in patients with acute diarrhea (4.0%) and a proportion of 2.3% in controls (Table 1). This result was similar to that found by Hien et al. (2007), that although EPEC was more frequent in cases (2.8%) than in controls (0.8%), it was not statistically significant associated with diarrhea. However, these findings differed from several studies, which point to EPEC as one of the major enteropathogens responsible for pediatric episodes of diarrhea, especially in poorly developed countries, where sanitary conditions are still very poor (Gunzburg et al., 1995; Dulguer et al., 2003; Alikhani et al., 2006; Orlandi et al., 2006; Nguyen et al., 2006; Paniagua et al., 2007; Ochoa et al., 2008).

Enteropathogenic *E. coli* is not common in developed countries, as it presents, for example, the best sanitation conditions. In the state of São Paulo, EPEC was one of the main pathogens observed in children, however, some evidence suggests that they are not very common in rural areas and/or smaller cities, which may explain the low frequency found at this study (Schnack et al., 2003).

In the control group, EAEC was the most frequent category (9.2%), followed by EPEC, with 2.3%. These results were similar to those of Nguyen et al. (2006), where

EAEC was the most frequent bacteria in controls (7.2%), followed by EPEC (4.4%). EAEC has been increasingly recognized as an important emerging enteric pathogen, widely distributed worldwide (Okeke et al., 2003; Huang et al., 2007);

When comparing the results between diarrheal and controls, it was observed that there was no statistically significant difference between the distribution of diarrheagenic *E. coli* in the diarrheal and control groups ($p = 0.5340$), on the other hand, the frequency of the *E. coli* pathogenic categories was statistically different between them ($p < 0.0001$). The results showed that the most frequent agent enteroaggregative *E. coli* (EAEC) was isolated in 5.9% of the population with diarrhea studied. In the present study, EAEC samples were also found in control group feces (9.2%). The results of the present study corroborate those found in a study conducted in Rio de Janeiro on the frequency of isolated diarrheagenic *E. coli* in children with and without diarrhea. EAEC was the most frequent category, with 14.6% of isolates. in patients with acute diarrhea and 11.1% in controls, suggesting that EAEC has a potential role as an enteric pathogen in the investigated community (Mangia et al., 2004).

In the present study enteroinvader *E. coli* was isolated in only 1 patient with acute diarrhea. This data was consistent with other studies in the literature, which estimate, for developing countries, including Brazil, isolation of this agent in proportions ranging from 1% to a maximum of 7% of cases (Tornieporth et al., 1995; Toporovski et al. al., 1999; Franzolin et al., 2005; Nguyen et al., 2006; Paniagua et al., 2007; Al-Gallas et al., 2007).

Shiga toxin producer *Escherichia coli* (STEC) is widely distributed worldwide, and is one of the most studied bacteria in the United States, causing more than 73,000 diarrheal episodes in the United States each year (Paniagua et al., 2007). It was not detected in any patient of the diarrheal group in the present study, but it was identified in one patient of the control group, similar results were observed by Toporovski et al. (1999) and Paniagua et al. (2007). This pathotype has recently been described as an emerging pathogen worldwide (Paniagua et al., 2007). However in Iran STEC is one of the most important causes of diarrhea, accounting for 44.7% of diarrheal isolates (Jafari et al., 2008).

In Brazil, STEC infections have been mainly associated with sporadic cases of non-bloody diarrhea, particularly in children (Guth et al., 2005). It is frequently detected in food and animal reservoirs in Brazil and other Latin American countries, and several animal serotypes have been identified associated with human diarrheal disease (Irino et al., 2004; Bastos et al., 2006; Bueris et al., 2007).

5 | CONCLUSION

Multiplex PCR assays have proved therefore to be an important tool for the rapid identification of pathogenic *E. coli* categories and can be routinely used in the molecular diagnosis of these categories in place of monoplex PCR. The present study also shows

the importance of diarrheagenic *E. coli* in cases of acute diarrhea in the municipality of Juruti, Pará, providing important support to diarrheal disease prevention and control measures in the region.

REFERENCES

- AL-GALLAS, N., BAHRI, O., BOURATBEEN, A., HAASEN, A.B., AISSA, R.B. Etiology of acute diarrhea in children and adults in Tunisia, Tunisia, with emphasis on Diarrheagenic *Escherichia coli*: prevalence, phenotyping, and molecular epidemiology. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **77**: 571-582, 2007.
- ALIKHANI, M.Y., MIRSALEHIAN, A., ASLANI, M.M. Detection of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Iranian children with and without diarrhoea. **Journal of Medical Microbiology**, **55**: 1159-1163, 2006.
- ARANDA, K.R.S., NETO, U.F., SCALETSKY, I.C.A. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, **42**: 5849-5853, 2004.
- ARANDA, K.R.S., FABBRICOTTI, S.H., NETO, U.F., SCALETSKY, I.C.A. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. **Federation of European Microbiological Societies**, **267**: 145-150, 2007.
- BALODA, S.B., KROVACEK, K., ERICSSON, L., LINNE, T., MANSSON, I. Detection of aerolysin gene in *Aeromonas* strains isolated from drinking water, fish, and foods by polymerase chain reaction. **Comparative Immunology and Microbiology Infectious Diseases**, **18**: 17-26, 1995.
- BASTOS, F.C., VAZ, T.M.I., IRINO, K., GUTH, B.E.C. Phenotypic characteristics, virulence profile and genetic relatedness of O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated in Brazil and other Latin American countries. **Federation of European Microbiological Societies**, **265**: 89-97, 2006.
- BONKOUNGOU, I.J.O.; HAUKKA, K.; ÖSTERBLAD, M.; HAKANEM, A.; J.; TRAORÉ, A.; BARROS, N.; SIITONEN. Bacterial and viral etiology of childhood diarrhea in Ouagadougou, Burkina Faso. **BMC Pediatrics**, 2013.
- BUERIS, V., SIRCILI, M.P., TADDEI, C.R., SANTOS, M.F.D., FRANZOLIN, M.R., MARTINEZ, M.B., FERRER, S.R., BARRETO, M.L., TRABULSI, L.R. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **102**: 839-844, 2007.
- CROXEN MA, LAW RJ, SCHOLZ R, KEENEY KM, WLODARSKA M, FINLAY BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev.**26(4):822–880. 2013.
- DUBREUIL J, ISAACSON R, SCHIFFERLI D. Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*, **EcoSal Plus** 2016.
- DULGUER, M.V., FABBRICOTTI, S.H., BANDO, S.Y., FILHO, C.A.M., NETO, U.F., SCALETSKY, I.C.A. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin and diarrhea. **The Journal of Infectious Diseases**, **188**: 1685-1694, 2003.
- FIEDORUK, K.; DANILUK, T.; ROZKIEWICZ, D.; ZAREMBA, M.L.; OLDAK, E.; SCIEPUK, M.; LESZCZNSKA, K. Conventional and molecular methods in the diagnosis of community-acquired diarrhoea in children under 5 years of age from the north-eastern region of Poland. **International. J. of Infectious Diseases** **37**: 145151, 2015.

FRANZOLIN, M.R. In: **Microbiologia**. Trabulsi, L.R. & Alterthum, F. (eds). Atheneu, 2005. p. 345-346.

GUNZBURG, S.T., TORNIEPORTH, N.G., RILLEY, L.W. Identification of Enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-Based Detection of the Bundle-Forming Pilus Gene. **Journal of Clinical Microbiology**, **33**: 1375-1277, 1995.

GUTH, B.E.C., GOMES, T.A.T., VAZ, T.M.I., IRINO, K. Inability to decarboxylate lysine as a presumptive marker to identify Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of serogroup O111. **Journal of Clinical Microbiology**, **41**: 3450p. 2003.

HAQUE, R., MONDAL, D., KIRKPATRICK, B.D., AKTHER, S., FARR, B.M., SACK, R.B., PETRI, W.A. Epidemiologic and clinical characteristics of acute diarrhea with emphasis on *Entamoeba histolytica* infections in preschool children in an urban slum of Dhaka, Bangladesh. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **69(4)**: 398-405, 2003.

HIEN, B.T.T., SCHEUTZ, F., CAM, P.D., SERICHANTALERGS, O., HUONG, T.T., THU, T.M., DALSGAARD, A. Diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* strains isolated from children in a Hospital Case-Control Study in Hanoi, Vietnam. **Journal of Clinical Microbiology**, **46**: 996-1004, 2007.

HUANG, D.B., MOHAMED, J.A., NATARO, J.P., DUPONT, H.L., JIANG, Z.D., OKHUYSEN, P.C. Virulence characteristics and the molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from travelers to developing countries. **Journal of Medical Microbiology**, **56**: 1386-1392, 2007.

IRINO, K., KATO, M.A.M.F., VAZ, T.M.I., RAMOS, I.I., SOUZA, M.A.C., CRUZ, A.S., GOMES, T.A.T., VIEIRA, M.A.M., GUTH, B.E.C. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo state, Brazil. **Veterinary Microbiology**, **105**: 29-36, 2004.

JAFARI, F., SHOKRZADEH, L., HAMIDIAN, M., AHRABI, S.S., ZALI, M.R. Acute diarrhea due to enteropathogenic bacteria in patients at hospitals in Tehran. **Journal of Infectious Diseases**, **61**: 269-273, 2008.

LANATA CF, FISCHER-WALKER CL, OLASCOAGA AC, TORRES CX, ARYEE MJ, BLACK RE. Global causes of diarrheal disease mortality in children, 5 years of age: a systematic review. **PLoS One** 2013.

MANGIA, A.H.R., GUTH, B.C., ANDRADE, J.R.C., IRINO, K., PACHECO, A.B.F., FERREIRA, L.C.S., ZAHNER, V., TEXEIRA, L.M. Genotypic and phenotypic characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains isolated in Rio de Janeiro city, Brazil. **Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical Microbiology**, **40**: 155-162, 2004.

NEJMA, B.S.B.; ZAAFRANE, M. H.; HASSINE, F.; LOULIZI, K.S.; SAID, M.B.; AOUNI, M.; MZOOGHI, R. Etiology of Acute Diarrhea in Tunisian Children with Emphasis on Diarrheagenic *Escherichia coli*: Prevalence and Identification of *E. coli* Virulence Markers. **Iranian J Publ Health**, No. 7, Vol. 43, p. 947-960, Jul, 2014.

NGUYEN, T.V., VAN, P.L., HUY, C.L., GIA, K.N., WEINTRAUB, A. Etiology and epidemiology of diarrhea in children in Hanoi, Vietnam. **International Journal of Infectious Diseases**, **10**: 298-308, 2006.

NGUYEN, T.V., VAN, P.L., HUY, C.L., GIA, K.N., WEINTRAUB, A. Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam. **Journal of Clinical Microbiology**, **43**: 755-760, 2005.

OCHOA, T.J., BARLETTA, F., CONTRERAS, C., MERCADO, E. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **National Institutes of Health**, **102**: 852-856, 2008.

OKEKE, I.N., OJO, O., LAMIKANRA, A., KAPER, J.B. Etiology of acute diarrhea in adults in Southwestern Nigeria. **Journal of Clinical Microbiology**, **41**: 4525-4530, 2003.

ORLANDI, P.P., MAGALHÃES, G.F., MATOS, N.B., SILVA, T., PENATTI, M., NOGUEIRA, P.A., SILVA, L.H.P.DA. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho, Rondonia, Western Amazon region, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **39**: 507-517, 2006.

PANIAGUA, G.L., MONROY, E., GONZÁLEZ, O.G., ALONSO, J., NEGRETE, E., VACA, S. Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, **6**: 17, 2007.

RAPPELLI, P., FOLGOSA, E., SOLINAS, M.L., DACOSTA, J.L., PISANU, C., SIDAT, M., MELO, J., CAPPUCCINELLI, P., COLOMBO, M.M. Pathogenic enteric *Escherichia coli* in children with and without diarrhea in Maputo, Mozambique. **Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical Microbiology**, **43**: 67-72, 2005.

SAMAL, S.K., KHUNTIA, S.H.K., NANDA, P.K., SATAPATHY, C.S., NAYAK, N.R., SARANGI, A.K., SAHOO, N., PATTNAIK, S.K., CHHOTRAY, G.P., PAL, B.B. Incidence of bacterial enteropathogens among hospitalized diarrhea patients from Orissa, India. **Journal Infectious Diseases**, **61**: 350-355, 2008.

SÁNCHEZ, J.; HOLMGREN, J. Virulence factors, pathogenesis and vaccine protection in cholera and ETEC diarrhea. **Current Opinion in Immunology**, Volume 17, Issue 4, 2005.

SCHNACK, F.J., FONTANA, L.M., BARBOSA, P.R., SILVA, L.S.M., BAILLARGEON, C.M.M., BARICHELLO, T., PÓVOA, M.M., CAVASINI, C.E., MACHADO, R.L.D. Enteropatógenos associados com diarréia infantil (< 5 anos de idade) em amostra da população da área metropolitana de Criciúma, Santa Catarina, Brasil. **Caderno de Saúde Pública do Rio de Janeiro**, **19**: 1205-1208, 2003.

STARNBACH, M.N., FALKOW, S., TOMPKINS, L.S. Species-specific detection of *Legionella pneumophila* in water by DNA amplification and hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, **27**: 1257-1261, 1989.

TOMA, C., LU, Y., HIGA, N., NAKASONE, N., CHINEN, I., BASCHKIER, A., RIVAS, M., IWANAGA, M. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, **41**: 2669-2671, 2003.

TOPOROVSKI, M.S., MÍMICA, I.M., CHIEFF, P.P., PASCHOALOTTI, M.A., DIAS, A.M.G., SILVA, C.B. Diarréia aguda em crianças menores de 3 anos de idade: recuperação de enteropatógenos nas amostras fecais de pacientes comparada à grupo controle. **Journal of Pediatric**, **75**: 97-104, 1999.

TORNIEPORTH, N.G., JOYLENE, J., SALGADO, K., JESUS, P., LATHAM, E., MELO, M.C.N.M., GUNZBURG, S.T., RILEY, L.W. Differentiation of pathogenic *Escherichia coli* strains in Brazilian children by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, **33**: 1371-1374, 1995.

TSUJI, H.; OSHIMA, K.; ISHIKAWA, K.; HAYASHI, K. An outbreak of heat-stable enterotoxin-producing *Escherichia coli* O25:HNM resistant to nalidixic acid caused by ingestion of contaminated box-lunch in September-october 2002 in Hyogo and shiga Prefectures. **Japanese Journal Infection Disease**, v. 55, p. 2015-206, 2002.

Wang J. Z., Duan R., Liang J. R., Huang Y., Xiao Y. C., Qiu H. Y., et al. Real-time TaqMan PCR for *Yersinia enterocolitica* detection based on the *ail* and *foxA* genes. **J. Clin. Microbiol.** 52, 2014.

PADRONIZAÇÃO DO CULTIVO DO *Aspergillus sp.* M2.3 PARA PRODUÇÃO DE AMILASE E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA ENZIMA

Data de aceite: 10/12/2019

Izabela Nascimento Silva

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri campus JK, Instituto de Ciência e Tecnologia, Diamantina-MG.

Tarcisio Michael Ferreira Soares de Oliveira

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri campus JK, Instituto de Ciência e Tecnologia, Diamantina-MG.

Alice Gomes Miranda

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri campus JK, Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis, Diamantina-MG.

Barbhara Mota Marinho

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri campus Janaúba, Instituto de Engenharia, Ciência e Tecnologia, Janaúba-MG.

Vivian Machado Benassi

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri campus JK, Instituto de Ciência e Tecnologia, Diamantina-MG.

RESUMO: O uso de enzimas em processos industriais deve ser precedido, necessariamente, do estudo do micro-organismo para obtenção de uma maior produção enzimática. O objetivo desse trabalho foi identificar linhagens fúngicas, coletadas e isoladas na cidade de Janaúba, no Norte de Minas Gerais, que produzam enzimas

amilolíticas, posteriormente, padronizar as condições de cultivo do fungo selecionado para uma maior produção enzimática, bem como caracterizar bioquimicamente a enzima. A partir da coleção de culturas do laboratório foram selecionadas quatro linhagens de fungos filamentosos identificados como M1.5, *Aspergillus sp.* M1.6, *Aspergillus sp.* M2.3 e *Aspergillus sp.* M2.4, para a determinação do potencial amilolítico de cada uma delas. Após os testes, o fungo considerado promissor foi o *Aspergillus sp.* M2.3, que apresentou maior atividade amilolítica em meio de cultura submerso CP, com sua própria solução de sais, durante dez dias de cultivo, à 30°C, de forma estacionária, tendo como fonte de nitrogênio o extrato de levedura acrescido de peptona, e o amido como a melhor fonte de carbono. Observando que a temperatura ótima da reação foi de 70 °C no pH 4,5, assim como, verificou-se um tempo de meia-vida de até 60 minutos à 50 °C, mantendo a atividade alta na faixa de pH 4,5 até 7,0 em um tempo superior à 120 minutos. Vale citar que, a enzima hidrolisou distintos substratos, em especial, amido solúvel e amido de milho. Conclui-se, então, que o trabalho possui grande relevância científica, uma vez que o fungo escolhido, *Aspergillus sp.* M2.3, possui uma atividade amilolítica significativa e apresentou características de relevância para a aplicação industrial.

1 | INTRODUÇÃO

Com o aumento da preocupação em relação ao meio ambiente, vem sendo cada vez mais importante a utilização de insumos renováveis e a substituição dos diversos processos químicos por processos biotecnológicos com maior eficiência nas atividades produtivas. Dessa forma, as indústrias passaram a utilizar tecnologias de biotransformação e biocatálise levando ao desenvolvimento de novos processos, e gerando produtos de melhor qualidade com um menor consumo energético e menor impacto ambiental (POLITZER; BON, 2006).

Com isso, tem-se as enzimas sobressaindo aos catalisadores químicos por apresentarem diversas vantagens, dentre elas, um menor consumo de energia, menor custo com máquinas, uma maior velocidade de reação e uma maior especificidade, além de serem bioconservadoras por minimizar a poluição e reduzir a quantidade de resíduos (CRUZ et al., 2011).

As enzimas são produzidas por todos os seres vivos, no entanto, a maioria das enzimas utilizadas nas indústrias são originadas dos micro-organismos, em especial a partir de fungos filamentosos. Isso porque, as enzimas produzidas por eles são de fácil extração, além da vantagem de uma grande produção enzimática em um curto período de tempo (BENASSI et. al, 2012).

A enzima que apresenta um maior interesse biotecnológico dentre todas já comercializadas e produzidas, são as que catalisam o amido, as amilases. Esse maior interesse por tal enzima, ocorre devido a sua aplicação em variadas áreas, por exemplo, nas indústrias de fermentação, couro, têxteis, alimentícia, papel e celulose e ração animal, entre outros (POLIZELI; SILVA, 2014).

Diante do exposto, o estudo dos fungos filamentosos para a produção e otimização de enzimas de importância industrial tem grande importância para o crescimento desta área no Brasil. Dessa forma, o presente estudo objetivou selecionar um fungo filamentoso potencial produtor de amilases, otimizar os parâmetros físico-químicos do cultivo do mesmo, e realizar a caracterização bioquímica das amilases.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

Os testes desse trabalho foram realizados no Laboratório de biologia do Instituto de Engenharia, Ciência e Tecnologia (IECT), da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) campus Janaúba, Minas Gerais, Brasil. Os micro-organismos foram cadastrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), número A64AD93.

2.1 Micro-organismo em estudo

O trabalho foi desenvolvido, inicialmente, com os fungos filamentosos identificados como M1.5 e *Aspergillus* sp. M1.6, ambos isolados da casca de árvore; bem como os micro-organismos *Aspergillus* sp. M2.3 e *Aspergillus* sp. M2.4 isolados da casca de um fruto, na cidade de Janaúba, no norte de Minas Gerais, Brasil (SOUSA, 2017).

2.2 Manutenção da cepa

As cepas foram mantidas no laboratório em meio de cultura sólido de aveia conforme Emerson (1941). Além disso, a manutenção do fungo foi feita em sílica gel de acordo com Michelin (2009).

2.3 Inóculo

Suspenderam-se as culturas dos fungos filamentosos em 10 mL de água destilada esterilizada, e um volume de 1 mL da suspensão de esporos (0,828.107 conídios/mL) foi inoculada em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio de cultura submerso. Os meios foram mantidos em estufa bacteriológica, de forma estática, à 30 °C.

2.4 Obtenção da massa micelial e do extrato enzimático

A massa micelial foi obtida após separação do meio de cultivo através de filtração à vácuo. Os filtrados contendo as enzimas brutas extracelulares foram submetidos à medição do pH, volume do extrato, e atividade amilolítica.

2.5 Dosagem da atividade amilolítica por determinação de açúcares redutores

A determinação da atividade enzimática foi realizada utilizando-se como substrato o amido Dinâmica® na concentração de 1 % (m/v) em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. A determinação ocorreu através da formação dos açúcares redutores durante a incubação da enzima com o amido, utilizando-se o ácido 3',5'-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959), sendo as leituras realizadas à 540 nm em espectrofotômetro Fento®. O método foi previamente padronizado por uma curva padrão de glicose (0,1 a 1,0 mg/mL), sendo a unidade de atividade (U.mL⁻¹) definida como a quantidade de enzima que hidrolisou um μmol de substrato por minuto por mL, nas condições de ensaio. A atividade total (U totais) = $\mu\text{mol/mL} \times \text{volume do filtrado}$.

2.6 Seleção do micro-organismo produtor de amilase

Para a escolha do fungo filamentoso para estudo, os quatro micro-organismos foram inoculados em meio de cultura submerso CP (PEIXOTO et al., 2003), previamente

esterilizado, sendo as culturas mantidas em estufa bacteriológica, à 30 °C, de forma estacionária, durante cinco dias.

2.7 Determinação do meio de cultura submerso para a produção amilolítica

Diferentes meios de cultura submersos foram analisados para a produção amilolítica pelos fungos *Aspergillus* sp. M2.3 e *Aspergillus* sp. M2.4, sendo esses: Meio CP (PEIXOTO et al., 2003), Meio SR sem NH₄H₂PO₄ (RIZZATTI et al., 2001), Meio Czapeck sem NaNO₃ e a concentração de KH₂PO₄ 30 % a menos que a concentração original (WISEMAN, 1975), bem como um meio de cultura proposto pela autora do trabalho, denominado de Meio INS composto por extrato de levedura 0,1 g; fonte de carbono 1 g; e solução de sais 5 mL (KH₂PO₄ 13 g, MgSO₄ 3,62 g, ZnCl₂ 0,07 g, FeCl₃ 0,66 g, CuSO₄ 0,0062 g para 1000 mL de água destilada) para cada 100 mL de cultivo. O crescimento ocorreu em estufa bacteriológica, durante cinco dias, à 30 °C.

2.8 Efeito da solução de sais do meio de cultura e do tempo de crescimento do fungo na produção enzimática

O teste do efeito de diferentes soluções de sais do meio de cultura submerso CP foi realizado utilizando-se as soluções: (1) sais do próprio meio CP, (2) sais Wesson Cinética® acrescido dos sais do meio CP e (3) sais Wesson Cinética® 0,05 % (m/v). Os meios foram mantidos em estufa bacteriológica, à 30 °C, por sete dias, sendo retirados a cada 24 horas.

2.9 Análise do efeito de fontes de nitrogênio na produção amilolítica

Neste experimento utilizou-se o meio CP com a própria solução de sais do meio, sendo analisadas três diferentes fontes de nitrogênio: (1) 0,8 % (m/v) de extrato de levedura, (2) 0,8 % (m/v) de peptona e (3) 0,04 % (m/v) de extrato de levedura acrescido de 0,04 % (m/v) de peptona. Os meios foram mantidos em estufa bacteriológica, à 30 °C, por dez dias.

2.10 Efeito da fonte de carbono do meio de cultura para produção de amilases

O fungo foi cultivado em meio CP com a própria solução de sais do meio, e 0,04 % (m/v) de extrato de levedura + 0,04 % (m/v) de peptona como fonte de nitrogênio. Analisando-se dez distintas fontes de carbono: amido Dinâmica®, amido de milho Maizena®, farinha de linhaça marrom Fito alimentos®, leite em pó CAMPONESA®, farinha de rosca, farinha de chia Fito alimentos®, farinha de trigo integral, farelo de aveia Fito alimentos®, farelo de trigo e palha de cana-de-açúcar in natura. Os meios foram mantidos em estufa bacteriológica, à 30 °C, por dez dias.

2.11 Determinação do efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática

As condições ideais de pH e temperatura no ensaio enzimático foram avaliadas determinando a atividade da amilase em diferentes temperaturas que variaram de 40

°C à 70 °C, com intervalos de 5 °C, utilizando os tampões acetato de sódio 100 mM para os pH 4,5; 5,0 e 5,5; e fosfato de sódio 100 mM para os pH 6,0, 6,5 e 7,0.

2.12 Estabilidade da enzima a diferentes temperaturas e pH

A estabilidade à temperatura foi avaliada através da incubação da enzima por 30, 60, 90 e 120 minutos, na ausência de substrato, nas temperaturas de 50 °C à 70 °C, com intervalo de 5 °C. Posteriormente, a atividade enzimática de cada amostra foi determinada nas condições ideais de pH e temperatura.

A estabilidade da enzima ao pH foi avaliada a partir da incubação do extrato enzimático em tampão acetato de sódio 100 mM para os pH 4,5; 5,0 e 5,5 e fosfato de sódio 100 mM para os pH 6,0; 6,5 e 7,0; durante 30, 60, 90 e 120 minutos, na ausência de substrato, em banho de gelo. Em seguida foi feita a determinação da atividade enzimática das amostras em tampão fosfato de sódio 200 mM nas condições ideais de pH e temperatura.

2.13 Análise da hidrólise de diferentes substratos

A determinação da atividade amilolítica frente diferentes substratos foi realizada utilizando-se os seguintes compostos: amido Dinâmica®, sacarose, amido de milho Maizena®, farinha de linhaça marrom Fito alimentos®, leite em pó Camponesa®, farinha de chia Fito alimentos®, farinha de trigo integral, farelo de aveia Fito alimentos®, farelo de trigo e palha de cana-de-açúcar, todos na concentração de 1 % (m/v) em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,5 à 70 °C.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Screening de fungos filamentosos produtores de amilase

Em estudos realizados por Sousa (2017) foi verificado que as linhagens M1.5, *Aspergillus* sp. M1.6, *Aspergillus* sp. M2.3 e *Aspergillus* sp. M2.4 tratam-se de fungos filamentosos potenciais produtores de amilases. Dessa forma, os mesmos foram cultivados em meio de cultura submerso CP (PEIXOTO et al., 2003), durante cinco dias, e verificou-se que os fungos identificados como M2.3 e M2.4 apresentaram maior atividade amilolítica, sendo esta de 174,860 U totais e 47,040 U totais, respectivamente, assim como, os fungos M1.5 e M1.6 apresentaram atividades inferiores, sendo o fungo M1.5 o fungo que apresentou menor atividade enzimática, quase 12 vezes menor que a atividade do M 2.3.

Os fungos filamentosos são micro-organismos com grande potencial de produção enzimática para aplicação industrial, por secretarem enzimas ao meio externo para hidrólise de polímeros a pequenos monômeros, os quais são absorvidos pela membrana plasmática do organismo. Devido a tal forma de nutrição tem-se um fácil acesso às enzimas (TREVISAN, 2004; DEACON, 2006).

A partir dos resultados da avaliação da atividade amilolítica das cepas selecionadas, os fungos filamentosos M 2.3 e M 2.4 foram cultivados em diferentes meios de cultura para escolha e padronização do micro-organismo a ser estudado.

3.2 Determinação do meio de cultura submerso para a produção amilolítica pelos fungos *Aspergillus* sp. M2.3 e *Aspergillus* sp. M2.4

Os fungos filamentosos *Aspergillus* sp. M2.3 e *Aspergillus* sp. M2.4 foram cultivados em quatro distintos meios e conforme os resultados obtidos percebeu-se que o melhor meio para produção amilolítica pelo *Aspergillus* sp. M2.3 foi o meio CP apresentando uma atividade de 175,370 U totais, sendo essa atividade 55 % maior quando comparado com o meio SR modificado. Enquanto que, quando comparada com a atividade amilolítica extracelular obtida com o crescimento desse fungo nos meios Czapeck e Khanna modificados, verificou-se uma atividade no meio CP superior de 98,5 % (Figura 1).

Em relação à produção amilolítica pelo fungo *Aspergillus* sp. M2.4, verificou-se que o meio submerso SR e o meio CP mostraram-se promissores para produção de amilase, obtendo uma atividade de 44,086 U totais e 44,723 U totais, respectivamente. Entretanto, a enzima produzida pelo fungo no meio INS foi de 5,304 U totais, sendo essa cerca de 12 % quando comparada ao meio CP, e o meio Czapeck não induziu a produção enzimática (Figura 1).

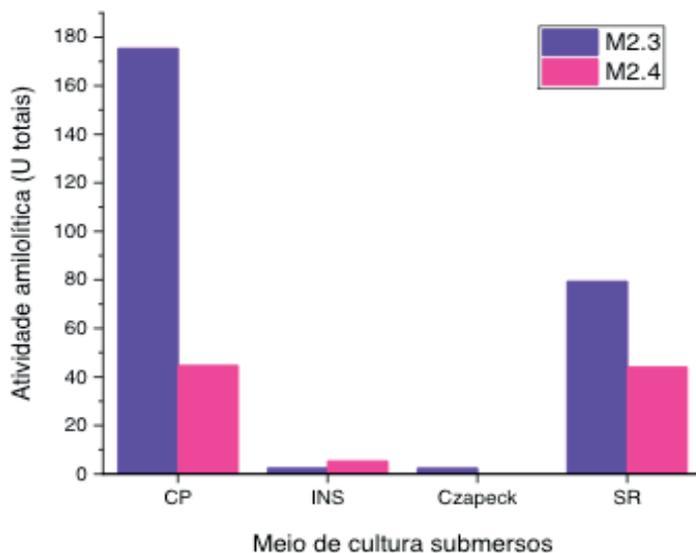


Figura 1- Determinação do meio de cultura para produção amilolítica pelos fungos *Aspergillus* sp. M2.3 e *Aspergillus* sp. M2.4.

O crescimento do micro-organismo em laboratório é realizado em meio de cultura, podendo ser simples ou complexo, mas com o principal objetivo de fornecer ao micro-organismo fonte de carbono, fontes de nitrogênio, água e íons inorgânicos essenciais, que tem a função de nutrir o micro-organismo, fazendo com que ele se desenvolva em tal meio aumentando ou diminuindo sua produção enzimática (BORZANI et al., 2001).

3.3 Determinação do tempo de crescimento e da solução de sais do meio de cultura para produção enzimática

Observou-se que o melhor meio para a produção amilolítica pelo *Aspergillus* sp. M2.3 foi o meio CP com sais do próprio meio, o qual apresentou uma atividade de 252,870 U totais no sétimo dia de cultivo, cerca de 56,3 % maior que o observado no meio CP acrescido de sais Wesson, e cerca de 86,6 % maior que o meio CP sem sais com sais Wesson (Figura 2).

Para o desenvolvimento do fungo só a presença das fontes de carbono e nitrogênio, geralmente, não são suficientes, sendo necessário acrescentar outros elementos como compostos inorgânicos, por exemplo, os íons enxofre, fósforo, magnésio e potássio, que é de grande valia para um bom desenvolvimento microbiano em pequenas quantidades (BORZANI et al., 2001).

Pressupondo-se que o fungo pode obter uma atividade amilolítica maior após o sétimo dia, cultivou o *Aspergillus* sp. M2.3 durante dez dias e verificou-se que a atividade da enzima quando o micro-organismo permaneceu sete dias à 30 °C correspondeu à 64 % da atividade do décimo dia (395,100 U totais), nas mesmas condições (Figura 2).

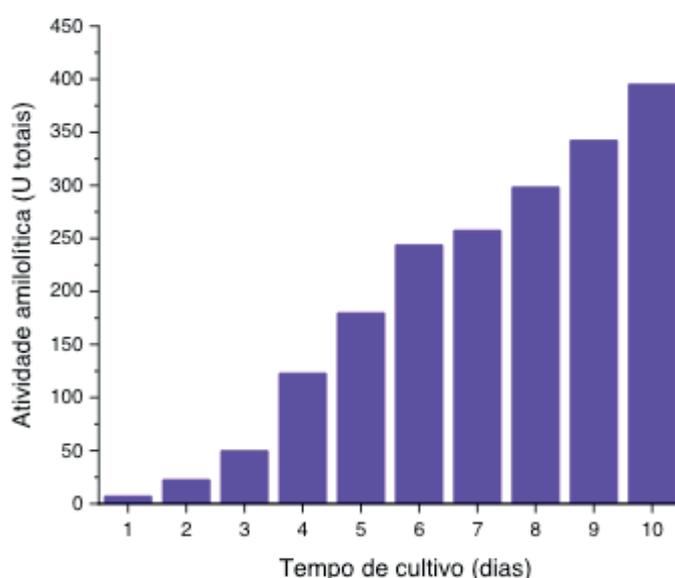


Figura 2- Determinação do tempo de cultivo do *Aspergillus* sp. M2.3 em meio submerso CP com sais do próprio meio para produção amilolítica.

Resultados obtidos por Pasin e colaboradores (2014), mostraram que o *Aspergillus japonicus* obteve sua maior atividade amilolítica no quarto dia de cultivo, resultados discordantes dos obtidos em nosso estudo; caracterizando uma variação de tempo de crescimento de fungos e produção enzimática dependendo do organismo.

Segundo Garcia (2013), o tempo de crescimento do fungo é de grande importância para a produção enzimática, caso o micro-organismo seja submetido à um cultivo muito prolongado pode ocorrer o esgotamento de nutrientes o que não é favorável para o

desenvolvimento do mesmo, da mesma forma, se o fungo for mantido em um período muito curto a produção enzimática pode não chegar ao seu valor máximo, visto que o fungo ainda esteja em uma fase de adaptação às condições do meio cultivado.

3.4 Determinação da fonte de nitrogênio do meio de cultura para a produção enzimática

A presença do nitrogênio no desenvolvimento de um micro-organismo é importante, por ser constituinte, por exemplo, de aminoácidos, ácidos nucleicos, e por possuir uma função reparadora na célula. Para possibilitar uma maior produção enzimática pelo fungo, a presença de no mínimo uma fonte de nitrogênio faz-se necessária, tanto, para os meios naturais quanto para sintéticos (FREITAS, 2014).

Dentre as fontes de nitrogênio testadas, o extrato de levedura associado à peptona sobressaiu-se como a fonte indutora de produção amilolítica, obtendo uma atividade de 649,810 U totais, 39 % maior que o extrato de levedura e 11 % maior que a peptona. Vale citar que, o micro-organismo não necessita de fonte de nitrogênio para produção enzimática, contudo, a atividade da amilase em meio contendo essa fonte chega a ser 6 vezes maior (Figura 3).

Dentre os estudos realizados por Saleem e Ebrahim (2014), a melhor fonte de nitrogênio para os fungos *A. niger* e *R. stolonifer* foi sulfato de amônia, diferente de Erdal e Taskin (2010) que obtiveram a peptona como melhor fonte de nitrogênio para uma melhor produção amilolítica pelo *Penicillium expansum*. No entanto, os resultados para o *A. japonicus* obtidos por Pasin e colaboradores (2014), mostraram que a produção de amilase não apresentou efeito significativo com o acréscimo de uma fonte de nitrogênio.

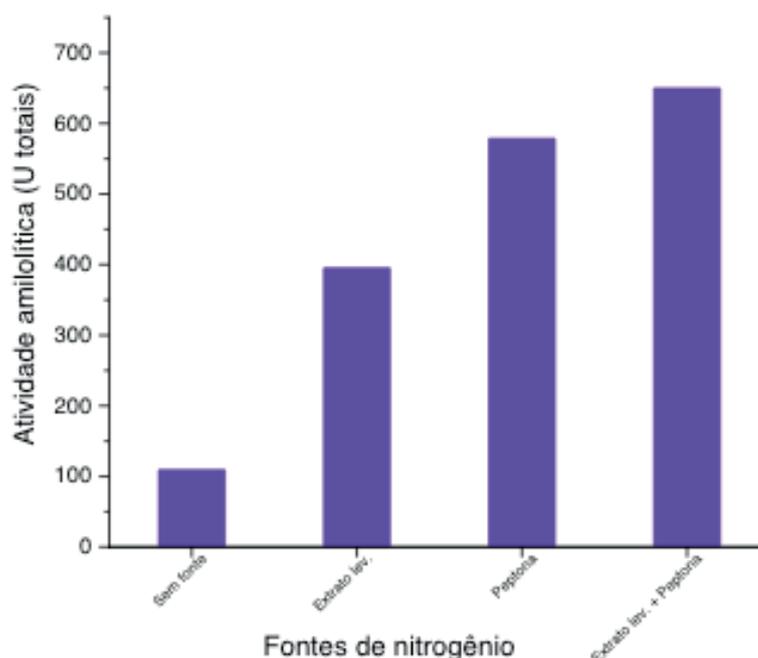


Figura 3- Análise da produção amilolítica pelo fungo *Aspergillus* sp. M2.3 utilizando-se distintas fontes de nitrogênio no meio submerso CP.

3.5 Produção de amilase por *Aspergillus* sp. M2.3 utilizando-se distintas fontes de carbono

Pode-se observar que a fonte de carbono de maior indução da atividade amilolítica tratou-se do amido solúvel, sendo ela 18 % maior que a farinha de rosca, e 59 % superior à farinha de trigo integral. Assim como, verificou-se uma baixa atividade da amilase quando o fungo foi cultivado em meio contendo palha de cana-de-açúcar (15,839 U totais) e farinha de chia (78,151 U totais) (Figura 4).

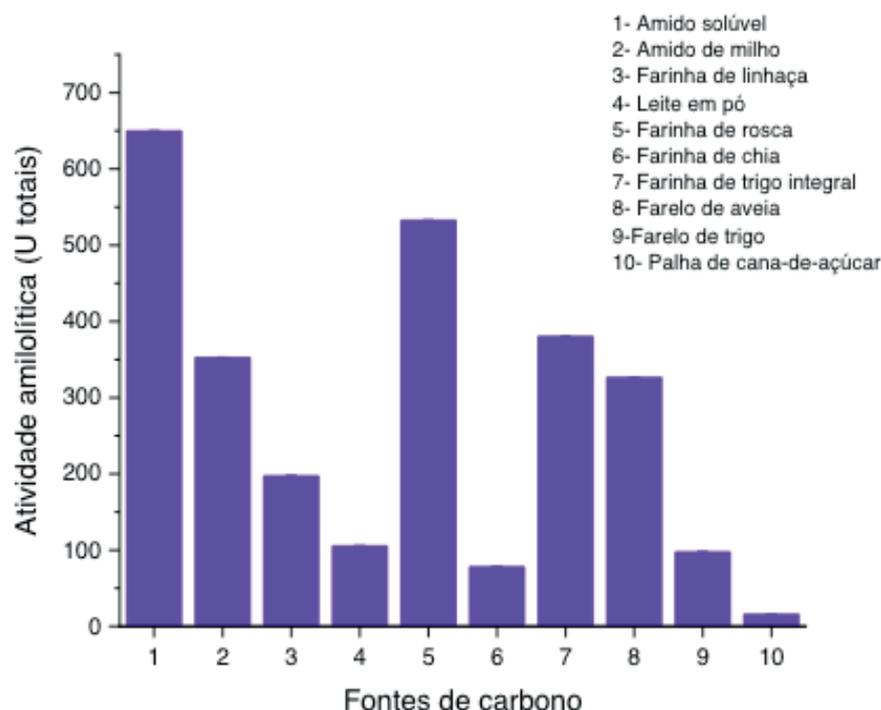


Figura 4- Análise da produção amilolítica pelo fungo *Aspergillus* sp. M2.3 utilizando-se distintas fontes de carbono.

Vale citar que, o amido também foi determinado como melhor fonte de carbono por Saleem e Ebrahim (2014) para os micro-organismos *A. niger* e *R. stolonifer*, assim como verificou-se por Chimatta et al. (2010) e por Gupta et al. (2008) para os respectivos fungos, *Aspergillus* MK07 e *A. niger*.

3.4 Determinação do efeito da temperatura e do pH na atividade amilolítica produzida pelo *Aspergillus* sp. M2.3

Verificou-se que para cada pH houve uma temperatura onde a atividade da enzima foi maior, assim como, observou-se que com o aumento do pH a atividade da enzima decaiu, independente da temperatura analisada. Por fim, constatou-se uma maior atividade amilolítica à 70 °C a um pH de 4,5 (Figura 5).

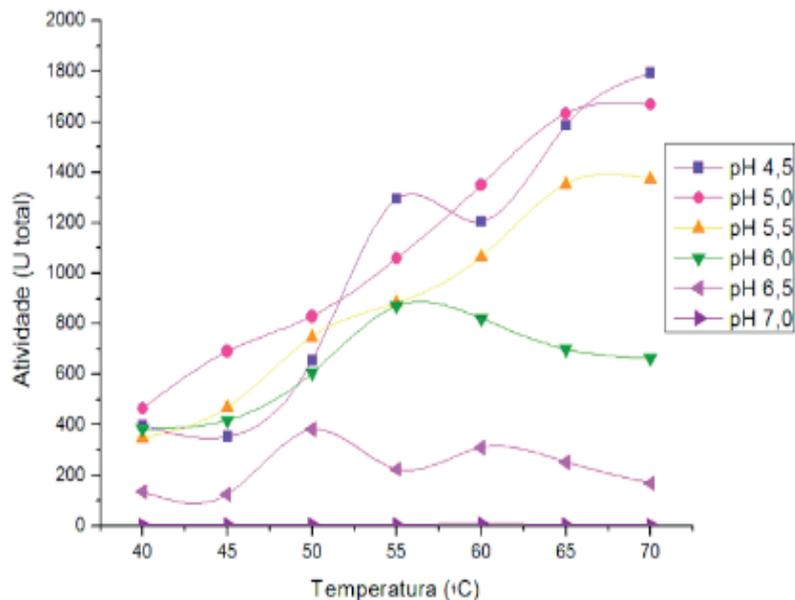


Figura 5- Efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática.

3.5 Estabilidade da enzima a diferentes temperaturas e pH

A amilase produzida pelo *Aspergillus* sp. M 2.3 apresentou elevada estabilidade à 50 °C, com tempo de meia-vida que ultrapassou 120 minutos, entretanto, em temperaturas superiores a essa, o tempo de a meia-vida foi bem menor (Figura 6). Assim como, observou-se uma estabilidade ao pH considerável em todos o pHs analisados. Entretanto, a faixa onde a enzima se mostrou mais estável foi em pH 4,5 apresentando pouca variação na atividade a partir dos 60 minutos de reação, em pH 5,0 a atividade da enzima no decorrer do tempo variou em média 13 %, bem como, nos demais pH 4,5; 5,5 e 7,0 no tempo de 120 minutos apresentaram, respectivamente, uma variação na atividade de 29,11 %, 24,04 % e 30,8 % em relação ao pH 5,0.

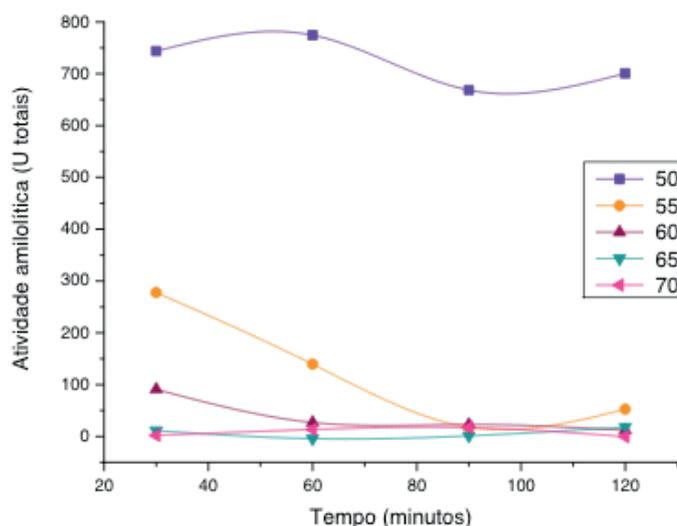


Figura 6- Estabilidade da amilase produzida pelo fungo *Aspergillus* sp. M2.3 à diferentes temperaturas.

3.6 Determinação da atividade amilolítica frente diferentes substratos

Observou-se que na presença do amido solúvel a atividade enzimática foi de 1868,82 U totais, entretanto, na presença do amido de milho a enzima apresentou uma maior atividade, sendo essa de 2627,09 U totais (Tabela 1). Vale citar que, a enzima hidrolisou os distintos substratos analisados, com exceção de Chia e palha de cana-de-açúcar (Tabela 1), resultado esse esperado devido a composição de ambos os materiais.

Substratos	Atividade (U totais)
Amido solúvel	1868,82
Amido de milho	2627,09
Chia	0
Farelo de aveia	59,58
Farelo de trigo	205,63
Farinha de trigo integral	203,29
Leite em pó	144,87
Linhaça	75,36
Palha de cana-de-açúcar	0
Sacarose	21,03

Tabela 1- Hidrólise de distintos substratos utilizando-se a amilase produzida pelo *Aspergillus* sp. M2.3.

4 | CONCLUSÃO

O presente trabalho analisou a produção de amilases a partir de quatro fungos filamentosos: M1.5, *Aspergillus* sp. M1.6, *Aspergillus* sp. M2.3 e *Aspergillus* sp. M2.4, destacando-se os micro-organismos M2.3 e M2.4.

Após a análise de diferentes meios de cultura, verificou-se que o produtor de maiores níveis amilolíticos foi o *Aspergillus* sp. M2.3 em meio submerso CP com sua composição de sais, tendo como fonte de nitrogênio o extrato de levedura juntamente com a peptona e o amido solúvel como fonte de carbono, durante dez dias de cultivo, à 30 °C, de forma estacionária em estufa bacteriológica.

As amilases sintetizadas pelo *Aspergillus* sp. M 2.3 apresentaram elevada estabilidade em diferentes pHs e temperaturas, além apresentarem uma alta atividade amilolítica em elevada temperatura (70°C), o que permite concluir que essas enzimas são de grande interesse para área industrial.

REFERÊNCIAS

BENASSI, V.M.; LUCAS, R.C.; MICHELIN, M.; JORGE, J.A.; TEREZI, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M. **Production and action of an *Aspergillus phoenicis* enzymatic pool using different carbon sources**. Brazilian Journal of Food Technology, v. 15(3), p 253-260, 2012.

BORZANI, W. et al. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Editora Blucher, v. 1, p 279, 2001.

CRUZ, E. A.; MELO, M.C.; SANANA, N. B.; FRANCO, M.; SANTANA, R. S. M.; SANTOS, L. S.; GONSALVES, Z. S.; **Produção de Alfa-Amilase por *Aspergillus niger* em resíduo de casca de mandioca**. UNOPAR, Cient Ciênc Biol Saúde, v. 12, p 245-249, 2011.

CHIMATTA, M.K.; SASIDHAR, P.; CHALLA, S.; **Production of extracellular amylase from agricultural residues by a newly isolated *Aspergillus* species in solid state fermentation**. Afr. J. Biotechnol, v. 9, p 5162-5169, 2010.

DEACON, J. W. **Fungal Biology**. Edinburgh. Blackwell Publishing, ed. 4, 2006.

EMERSON, R. **An experimental study of the life cycles and taxonomy of *Allomyces***. Lloydia, v. 4, p 77-144, 1941.

ERDAL, S.; TASKIN, M.; **Production of α -amylase by *Penicillium expansum* MT-1 in solid state fermentation using waste loquat (*Eriobotrya japonica* Lindley) kernels as substrate**. Rom. Biotechnol. Lett, p 5342 – 5350, 2010.

FREITAS, L. S.; MARTINS, E. S.; FERREIRA, O. E. **Produção e caracterização parcial de α -amilase de *Syncephalastrum racemosum***. Revista Brasileira de Biociências, v. 26, p 266- 232, 2014.

GARCIA, R. C.; **Produção e caracterização parcial das amilases de *Colletotrichum graminicola***. Trabalho de conclusão do curso Bacharel em ciências biológicas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

GUPTA, A.; GUPTA, V.K.; MODI, D.R.; YADAVA, L.P.; **Production and characterization of α -amylase from *Aspergillus niger***, Biotechnology, v. 7, p 551-556, 2008.

MICHELIN, M. et al. **Purification and characterization of a thermostable α -amylase produced by the fungus *Paecilomyces variotii***. Carbohydrate Research, v. 345, p 2348–2353, 2010.

MILLER, G.L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar**. Anal. Chem., v 31, p 426-428, 1959.

PASIN, T.M.; BENASSI, V.M.; MOREIRA, E.A.; JORGE, J.A.; POLIZERI, M.L.T.M.; **Prospecting Filamentous Fungi for Amylase Production: Standardization of *Aspergillus japonicus* Culture Conditions**, British Biotechnology Journal, v. 4, p 482-498, 2014.

PEIXOTO, S. C., et al. ***Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases**. Int. Microbiol., v. 6, p 269-273, 2003.

POLITZER, K.; BON, E. P. S. Enzimas Industriais e Especiais. **Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, Ciência, Tecnologia e Inovação**, IQ/UFRJ, Rio de Janeiro, mai. 2006.

POLIZELI, M.L.T.M.; SILVA, Tony M. **Amilases microbianas**. Edusp Editora, 2014.

RIZZATTI, A.C.S.; JORGE, J.A.; TERENCEZI, H.F.; RECHIA, C.G.V.; POLIZELI, M.L.T.M. **Purification and properties of a thermostable extracellular α -D-xylosidase produced by thermotolerant *Aspergillus phoenicis***. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., v 26, p 156-160, 2001.

SALEEM, A.; EBRAHIM, M.K.H.; **Production of amylase by fungi isolated from legume seeds collected in Almadinah Almunawwarah**, Saudi Arabia, Science Direct, Journal of Taibah University for Science, v. 8, p 90-97, 2014.

SOUSA, M. T. S.; **Prospecção de fungos filamentosos e produção de amilases por *Aspergillus sp. M1.7.2***, 2017. Trabalho de conclusão de curso – Curso Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Janaúba. 2017.

TREVISAN, H.C. “Lipases”. In: SAID, S. & PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agente Biotecnológico**. 1. ed. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, p 115-135, 2004.

WISEMAN, A. **Hand book of enzyme biotechnology**. Ellis Horwood Ltd John Wiley & Sons, p148, 1975.

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA PARA CONSUMO EM ESCOLAS DO KM 13.5, 14 E 16, MINGA GUAZÚ, PARAGUAI (2017-2018)

Data de submissão: 12/11/2019

Data de aceite: 10/12/2019

Eva Fabiana Mereles Aranda

Laboratório de Águas e Alimentos, Centro de Investigações Médicas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidad Nacional del Este (CIM/FACISA/ UNE).

Minga Guazú - Paraguai. *Autor Correspondente.

Currículo: <https://cv.conacyt.gov.py/publicar/cv?id=bec9de20d3d407c640e524d922f51b46>

María Belén Chilavert González

Faculdade de Ciências da Saúde, Universidad Nacional del Este - UNE.

Cidade do Leste – Paraguai.

Currículo: <https://cv.conacyt.gov.py/publicar/cv?id=bc94a628a63efff33356d1ca98c0d96e>

María Andrea Guillen Encina

Faculdade de Ciências da Saúde, Universidad Nacional del Este - UNE.

Cidade do Leste – Paraguai.

Currículo: <https://cv.conacyt.gov.py/publicar/cv?id=efd3574bfad7867fa03129d39764f69f>

Omar Ariel Burgos Paster

Faculdade de Ciências da Saúde, Universidad Nacional del Este - UNE.

Cidade do Leste – Paraguai.

Currículo: <https://cv.conacyt.gov.py/publicar/cv?id=22b06a2070a729abe3f7db92bac05337>

Rossana Haydee Cañete Lentini

Faculdade de Ciências da Saúde, Universidad

Nacional del Este - UNE.

Cidade do Leste – Paraguai.

Currículo: <https://cv.conacyt.gov.py/publicar/cv?id=6dc2ac731be2649b18e96f8863e23468>

Sady María González Fariña

Faculdade de Ciências da Saúde, Universidad Nacional del Este - UNE.

Cidade do Leste – Paraguai.

Currículo: <https://cv.conacyt.gov.py/publicar/cv?id=aca12cf07d3492f3cc24c97cf32edb80>

Asuka Shimakura Tsuchida

Faculdade de Ciências da Saúde, Universidad Nacional del Este - UNE.

Cidade do Leste – Paraguai.

Currículo: <https://cv.conacyt.gov.py/publicar/cv?id=3bfededa3984b660af962b5f14ee462>

Gregor Antonio Cristaldo Montiel

Faculdade de Ciências da Saúde, Universidad Nacional del Este - UNE.

Cidade do Leste – Paraguai.

Currículo: <https://cv.conacyt.gov.py/publicar/cv?id=160317e0371af383d6e8c1664f32d52e>

Catherin Yissel Ríos Navarro

Faculdade de Ciências da Saúde, Universidad Nacional del Este - UNE.

Cidade do Leste – Paraguai.

Currículo: <https://cv.conacyt.gov.py/publicar/cv?id=1eec2aace340b8fcbbed78431d916b3c>

Andrea Giménez Ayala

Faculdade de Ciências da Saúde, Universidad Nacional del Este - UNE.

Cidade do Leste – Paraguai.

RESUMO: Água potável ou água para consumo humano é aquela que pode ser usada sem restrições para beber ou preparar alimentos, por isso deve estar livre de microrganismos patogênicos. O objetivo desta pesquisa foi determinar a qualidade microbiológica da água potável nas escolas no km 13.5, 14 y16 de Minga Guazú (Paraguai). Trata-se de um estudo observacional, quantitativo, descritivo e de corte transversal. Foram avaliadas 24 amostras de água de 19 escolas, extraídas do poço comum e de poços artesianos. Foi utilizada a técnica de filtração por membrana e culturas microbiológicas em placas Petrifilm® para a determinação de coliformes, totais, coliformes fecais, contagem mesofílica aeróbica e sulfitos redutores. Os resultados revelaram que 87,5% das amostras coletadas nas escolas apresentaram crescimento de microrganismos indicando contaminação. 83,3% apresentaram valores coliformes totais, em níveis acima dos valores-limite estabelecidos pela Norma Paraguaia NP 2400180 (6ª edição), 70,8% para coliformes fecais, 54,2% para contagens aeróbios mesófilos e 62,5% para Clostridium sulfito-redutores. Após análise dos resultados, concluiu-se que a maioria das amostras coletadas foram classificadas como imprópria para consumo humano. As fontes de água com maior número de microrganismos patogênicos foram os poços comuns e o grupo de germes mais frequente foi o de coliformes totais.

PALAVRAS-CHAVE: Qualidade da água, Escolas, Exposição Ambiental, Patógenos Biológicos, Paraguai.

MICROBIOLOGICAL QUALITY OF WATER FOR CONSUMPTION IN SCHOOLS OF KM 13.5, 14 AND 16, MINGA GUAZÚ, PARAGUAY

ABSTRACT: Drinking water or drinking water is water that can be used without restriction for drinking or preparing food, so it must be free of pathogenic microorganisms. The objective of this research was to determine the microbiological quality of drinking water in schools in km 13.5, 14 y16 of Minga Guazú (Paraguay). This is an observational, quantitative, descriptive and cross-sectional study. Twenty-four water samples from 19 schools from the common well and artesian wells were evaluated. The technique of membrane filtration and microbiological cultures in Petrifilm® plates was used to determine coliforms, totals, fecal coliforms, aerobic mesophilic count and reducing sulfites. The results revealed that 87.5% of the samples collected in schools showed microorganism growth indicating contamination. 83.3% had total coliform values at levels above the limit values established by the Paraguayan Standard NP 2400180 (6th edition), 70.8% for fecal coliforms, 54.2% for mesophilic aerobic counts and 62.5%

for Clostridium. sulfite reducers. After analyzing the results, it was concluded that most of the samples collected were classified as unfit for human consumption. The water sources with the largest number of pathogenic microorganisms were the common wells and the most frequent group of germs was the total coliform.

KEYWORDS: Water Quality, Schools, Environmental Exposure, Biological Pathogens, Paraguay.

1 | INTRODUÇÃO

A água potável deve ser adequada ao consumo humano, às tarefas domésticas e à limpeza do corpo (MUÑOZ, 2013; OMS, 2006).

Os depósitos de água subterrâneos, apesar de serem naturalmente protegidos, não estão livres de agentes poluentes. Estão expostos à contaminação com a água do esgoto devido à proximidade das redes de drenagem, infiltração de contaminantes no solo, quantidade de chuvas, etc.(AVILA DE NAVIA, 2013). Por esse motivo, as fontes de água devem ser protegidas do contato com as fezes, pois podem transportar microrganismos patogênicos (UNESCO, 2016) ocasionando a contaminação mesmo na água em depósitos subterrâneos tratados com cloro (RIOS-TOBON et al., 2017, OMS, 2006).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), é importante escolher um local adequado onde será feita a perfuração do poço, proteger a fonte de armazenamento da contaminação, melhorando, assim, a qualidade da água obtida de poços artesanais (OMS, 2006).

Os principais resultados da avaliação rápida mostram que 68% da população do Paraguai recebem água com baixos níveis de cloro residual livre, colocando em risco a saúde humana e apenas 32% recebem com níveis de concentração entre 0,5 e 2,0 PPM , que permitem proteger a qualidade da água e, portanto, a saúde da população, Em relação aos níveis de coliformes fecais, constatou-se que 65% recebem água com baixos níveis de concentração de Coliformes < 2 e 35% recebem com níveis de Coliformes entre 2 a 100 (OPS, 2019).

O Paraguai conta com aquífero guarani, uma reserva de água potável de 40.000 km³, que ocupa aproximadamente 1.170.000 km². É a terceira maior reserva de água doce do mundo, com capacidade para abastecer toda a população mundial durante os próximos dois séculos (FARINA et al., 2004). Mesmo com essa reserva, a rede de distribuição de água potável não atinge toda a população das áreas urbanas e dificilmente atinge a área rural.

No departamento do Alto Paraná, a distribuição da água potável é escassa para os moradores. Minga Guazú (**Figura 1**) está localizado no km 16 e possui uma população de 60.719 habitantes (DGEEC, 2018). É o quarto município com a maior população do Alto Paraná, e o 31° do Paraguai. Segundo o Governo do Alto Paraná (2019) ocupa uma área de 489,5 km², delimitado entre os rios Acaray e Monday. Devido ao grande

número de habitantes e ao acesso precário à água potável, a população está suscetível à contaminação e infecção por doenças de veiculação hídrica, principalmente crianças, por sua vulnerabilidade em adquirir infecções por microrganismos transmitidos pela água contaminada (ARCOS PULIDO et al., 2005).



Figura 1 – Localização geográfica da cidade Minga Guazú no Paraguai.

Imagem disponível em: https://pt.wikipedia.org/wiki/Minga_Guaz%C3%BA#/media/Ficheiro:Paraguay_location_map.svg

A maioria das escolas primárias, em pelo menos 60 países em desenvolvimento, não possui instalações de água adequadas e quase dois terços não têm saneamento apropriado. Essa situação significa que milhões de crianças frequentam escolas que não têm acesso a água potável de qualidade para o consumo (OMS, 2006).

Para se determinar a contaminação microbiológica, é realizada a busca de indicadores de contaminação na água como coliformes totais (CT), coliformes fecais (CF), aeróbios mesófilos (AM), *Clostridium sulfitos redutores* (CSR) (WHO, 2014; ARCOS PULIDO et al., 2005; GESCHE et al., 2003).

Uma das principais causas para o aumento da contaminação da água é o crescimento da população e o aumento do uso da água para diferentes atividades. A contaminação fecal da água pode ser de origem humana ou animal e se deve à presença de microrganismos patogênicos, principalmente os dos grupos dos coliformes que estão presentes na flora bacteriana intestinal, sendo *Escherichia coli* (*E.coli*) a mais representativa em aproximadamente 90% dos casos (FRANCO et al, 2014; LARREA-

MURRELL, et al., 2013).

Os CT são bactérias Gram negativas em forma de bacilos, fermentam lactose a 35-37°C, produzem ácido y gás (CO₂) em 24h, aeróbias o anaeróbias facultativas, oxidase negativa, não formam esporos e apresentam atividade enzimática β-galactosidase. Entre elas, se encontram a **Escherichia coli**, **Citrobacter**, **Enterobacter** y **Klebsiella** (FRANCO, et al, 2014).

O crescimento dos coliformes totais é um indicador de contaminação fecal no controle da qualidade da água destinada ao consumo humano, em razão de que, nos meios aquáticos, os coliformes são mais resistentes que as bactérias patógenas intestinais e principalmente porque sua origem é (FRANCO, et al, 2014; UNAM, 2012) Caso seja encontrado coliformes na água, isso se deve a uma contaminação recente, e constitui um indicador de degradação de corpos na água (ARCOS PULIDO et al., 2005).

Coliformes fecais são aqueles incluídos no grupo anterior (coliformes totais), que também são capazes de fermentar lactose, com produção de ácido e gás a 44 ° C, em um tempo máximo de 24 horas (CARMONA et al., 2017; ALBA et al., 2013) são resistentes a altas temperaturas, então eles são chamados de termo-tolerantes. Podem causar infecções oportunistas no trato respiratório, sepse, diarreia aguda, infecções de pele e tecidos moles, entre outras patologias (ROCHA et al., 2011; MARCOS PULIDO et al., 2005).

A presença de bactérias aeróbias mesófilas na água reflete a exposição das amostras à contaminação em geral, a existência de condições favoráveis para a multiplicação desses microrganismos e a presença de matéria orgânica (UNAM, 2012).

Os esporos de CSR e da *Clostridium perfringens* são utilizados como indicadores de contaminação fecal, já que são excepcionalmente resistentes a vários tipos de estresse ambiental e sobrevivem a grandes períodos de tempo na água(5). Os anaeróbios sulfito-redutores constituem um grupo associado a Clostridium. São deteriorantes, uma vez que produzem odores desagradáveis. Esses microrganismos possuem a capacidade de reduzir os sulfitos a sulfetos a partir de aminoácidos e compostos sulfurados. Devido as características que possuem os anaeróbios sulfito-redutores foi que se propôs estes como indicadores de alto risco de poluição da água (GESCHE et al., 2003). Segundo a Norma Paraguaia NP 2400180 (Água Potável. Requisitos Gerais), a água para consumo deve estar isenta de coliformes totais e fecais, e as bactérias aeróbias mesófilas terem um limite de até 500 Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/ml (INTM, 2011a).

As políticas públicas de saúde devem garantir o acesso à água tratada adequadamente, de forma a não oferecer riscos aos usuários que a consomem, principalmente crianças (COSTA NASCIMENTO et al., 2017). Alternativas como capacitação dos professores, pais e alunos, conferências educacionais, instalação de filtros de água, fornecimento de produtos para desinfecção (Hipoclorito de Sódio a 2,5%) são essenciais para alcançar resultados bem-sucedidos (RIBEIRO et al., 2018).

Nenhum registro anterior foi encontrado sobre a qualidade microbiológica da água nas escolas de Minga Guazú (Paraguai), em vista disso, esta pesquisa objetivou determinar a qualidade microbiológica da água utilizada nas escolas localizadas nos km 13.5, 14 y 16, descrevendo a frequência de microrganismos indicadores, os tipos de fontes de água em conformidade com NP 2400180.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

A presente pesquisa se trata de um estudo observacional, quantitativo, descritivo e de corte transversal. Foi realizado em escolas localizadas nos km 13.5, 14 e 16 no distrito de Minga Guazú, que se está localizado a 20 km da zona de fronteira entre os países Brasil e Argentina.

Foram coletadas amostras de água das 19 escolas participantes, em várias fontes, de acordo com a metodologia estabelecida na NP 2400581 (INTN, 2011b) “*Amostragem para análise físico-química e bacteriológica da água*”, em sacos de polietileno estéreis Whirlpack® de Thomas Scientific, no período compreendido entre maio de 2017 a junho de 2018 sendo transportadas adequadamente sobre refrigeração até o laboratório responsável pela análise.

Para a determinação dos coliformes totais e fecais pela técnica de filtração por membrana, 100 ml de água foram filtrados através de filtros Pall estéreis de 0,45 micron de poro, e se realizou o cultivo em placas AquaPetrifilm®, a 45°C y 37°C respectivamente durante 48 horas. Para o isolamento de aeróbios mesófilos se cultivou em 1 ml de água em placas AquaPetrifilm®, a 37°C, durante 48 horas, e para a determinação de sulfitos redutores se utilizou o meio de cultivo PathoScreen™, a 25°C, durante 48 horas.

3 | RESULTADOS

Foram coletadas 24 amostras de 19 escolas. A maioria das escolas tinha um tipo de fonte de água, mas cinco delas tinham duas fontes de água: poço comum e poço artesiano (Tabela 1).

Tipo de fonte de água	Frequência	
	n	%
Poço comum	16	66.7
Poço artesiano	8	33.3
TOTAL	24	100

Tabela 1 – Fonte de água das escolas do km 13.5,14 y 16 de Minga Guazú, Paraguay 2017-2018

Fonte: Eva Fabiana Mereles ARANDA, E.F.M et al. Qualidade microbiológica da água para consumo em escolas do KM 13.5, 14 e 16, Minga Guazú, Paraguai (2017-2018).

Em relação à frequência de microrganismos indicadores, 83,3% (n = 24) eram do grupo coliforme total, a maioria das amostras apresentou valores fora do previsto na NP 2400180 para adequação ao consumo humano (**Tabela 2**)

Microrganismos indicadores	Frequência	
	n	%
Coliformes totais	20	83,3
Coliformes fecais	17	70,8
Contagem de aeróbios mesófilos	13	54,2
Clostridium sulfito redutores	15	62,5

Tabela 2 – Frequência de microrganismos das escolas do km 13.5,14 y 16 de Minga Guazú, Paraguay 2017-2018

Fonte: Eva Fabiana Mereles ARANDA, E.F.M et al. Qualidade microbiológica da água para consumo em escolas do KM 13.5, 14 e 16, Minga Guazú, Paraguai (2017-2018).

No que diz respeito à conformidade com a NP 2400180, de acordo com as fontes de água, verificou-se que a maioria da água que está adequada ao consumo é proveniente de poços artesianos (**Tabela 3**).

Fonte de Água	Cumpre com a NR 2400180	%
Poço comum	1/16	6.25
Poço artesiano	2/8	25

Tabela 3 - Cumprimento da NP 2400180 para o consumo de água em escolas do km 13.5,14 y 16 de Minga Guazú, Paraguay 2017-2018.

Fonte: Eva Fabiana Mereles ARANDA, E.F.M et al. Qualidade microbiológica da água para consumo em escolas do KM 13.5, 14 e 16, Minga Guazú, Paraguai (2017-2018).

4 | DISCUSSÃO

Os achados aqui apresentados revelaram que 87,5% (21/24) das amostras de água coletadas nas escolas apresentaram microrganismos indicadores de contaminação; portanto, essas águas representam um risco à saúde dos estudantes que as consomem.

Em 83,3% (20/24) e 70,8% (17/24) das amostras, foram encontrados coliformes totais e fecais, e resultados semelhantes são descritos em escolas de Irapuato, México, onde os coliformes fecais foram apresentados fora de classificação em uma escola pública (GÓMEZ et al., 2008). Em uma análise sobre a contaminação biológica de uma escola secundária número 18, no estado de Águas Quentes no México, foi encontrado coliformes totais e fecais fora dos limites permitidos, enquanto que nas escolas rurais de Colônia, em oito escolas, os poços foram inabilitados por presença de coliformes fecais (GONZÁLEZ, 2008).

Um estudo realizado em 13 escolas na cidade de Crateús no estado do Ceará (Brasil), constatou-se contaminação por coliforme fecais em 46,2% das amostras

(COSTA NASCIMENTO et al., 2017). Em outro estudo realizado em Manaus, capital do estado do Amazonas, também no Brasil, foram encontrados coliformes em 55% das fontes de água nas escolas, um resultado que preocupa pela a exposição das crianças à doenças de veiculação hídrica, que podem ser agravadas pela baixa imunidade, bem como estado nutricional (FERNANDEZ et al., 2013).

Em 54,2% (13/24) das amostras, aeróbios mesófilos foram encontrados fora dos limites da NP 2400180. Esse resultado é semelhante ao da zona central do Paraguai, na qual 61,5% das amostras apresentaram contagens aeróbios mesófilos fora do estabelecido na NP (SOTOMAYOR et al, 2013).

62,5% (15/24) das amostras apresentaram resultados positivos para Clostridium sulfitos redutores, indicando contaminação de alto risco pela água, que nas amostras foram positivas em 42%. Essa contaminação pode ter origem fecal ou de outras fontes ambientais (GESCHE et al., 2013).

Os poços comuns nas escolas contavam com um sistema de armazenamento de água em tanques de 300 a 500 litros, colocados em uma altura variando entre 10 a 15 metros. Alguns se encontravam bem fechados, outros fechados parcialmente, e a menor parte encontrava-se totalmente descoberta, o que poderia facilitar a contaminação por fezes de pássaros ou outros animais.

5 | CONCLUSÃO

É de extrema importância que sejam estabelecidas várias medidas sanitárias no que se refere às condições de armazenamento que se encontram as águas, pois elas são um recurso imprescindível para a vida, tanto do ser humano como dos animais. É possível minimizar a contaminação através da limpeza periódica dos depósitos, manutenção adequada das instalações hidráulicas e tratamento da água.

6 | CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declararam não ter havido qualquer conflito de interesse.

7 | CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Ambos os autores contribuíram com a idealização do estudo, a análise e a interpretação dos dados e com a redação do manuscrito, aprovando a versão final publicada. Declaram-se responsáveis pelo conteúdo integral do artigo, garantindo sua precisão e integridade.

REFERÊNCIAS

- ALBA, J et al. Riesgos microbiológicos en agua de bebida: una revisión clínica. **Quim Viva**. 2013;3:215–33.
- ARCOS PULIDO et al. Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. **Revista NOVA - Publicación Científica en Ciências Biomédicas**. 2005; 3(4):69–79.
- AVILA DE NAVIA, S. L.; ESTUPINAN TORRES, S.M. Calidad sanitaria del agua del Parque Natural Chicaque. **Nova, Bogotá**, v. 11, n. 20, p. 39-44, 2013.
- CARMONA, T.J et al. Evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico por consumo de agua en San Cristóbal de Las casas, Chiapas, México. **Tecnol y Ciencias del Agua**. 2017; VIII(1):133–53.
- COSTA NASCIMENTO et al.. **Avaliação da potabilidade da água de escolas públicas do município de Crateús: Uma questão de saúde pública**. Encontro Internacional de Jovens Pesquisadores. 2017; 7 (83):12.
- Dirección General de Estadística, Encuestas y Censos (DGEEC). **Principales resultados del Censo 2018. Vivienda y Población**. [Internet]. 2019. Disponible em: <https://www.dgeec.gov.py/>. Acceso em: 10 set. 2019.
- FARINA, S et al. **Caracterización hidrogeológica e hidrogeoquímica del Sistema Acuífero Guaraní (SAG) en la Región Oriental del Paraguay al sur de la latitud 25°30'**. In: XIII Congresso Brasileiro de Águas Subterráneas. 2004. p. 1–24.
- FERNANDEZ, C.; HIPÓLITO, J.; WAICHMAN, A. Avaliação da qualidade da água de poço. Assessment the quality of well-water. **Rev Inst Adolfo Lutz**. 2013;72(1):53–8.
- FRANCO, P.A.; LÓPEZ, L.A.; OROZCO, M.E. Calidad microbiológica del agua destinada para consumo humano en siete municipios de la región Caribe Colombiana. **Cienc Actual**. 2014; 3:60–9.
- GESCHE, E.; VALLEJOS, A.; SAENZ, M. Eficiencia de Anaerobios sulfito-reductores como indicadores de calidad sanitaria de agua. Método de Número Más Probable (NMP). **Arch Med Vet**. 2003 Jan [cited 2017 Aug 3];35(1):99–107.
- GÓMEZ, F.; MARQUEZ, M.; ITURVIDE, F. Análisis microbiológico de la calidad del agua en escuelas de Irapuato, GTO. Instituto Tecnológico Superior de Irapuato. 2008; 2.
- GONZÁLEZ, N. **Contaminación microbiológica en el agua de la escuela secundaria número 18**. Subsecretaría de educación media superior Dirección general de educación tecnológica industrial Coordinación de enlace operativo de Aguascalientes [Internet]. 2008. Disponible em: <https://es.scribd.com/doc/11567692/coliformes-en-agua>. Acceso em: 5 Set. 2019.
- Governo do Alto Paraná. Governo Departamental. Minga Guazú. Disponible em: <http://www.altoparana.gov.py/v0/index.php/91-distritos?start=10>. Acceso em: 28 out. 2019.
- Instituto Nacional de Tecnología Normalización y Metrología (INTN). **Norma Paraguaya NP 2400180. Agua Potable. Requisitos Generales**. 2011a.
- Instituto Nacional de Tecnología Normalización y Metrología (INTN). **Norma Paraguaya NP 2400581. Toma de muestras para el análisis físico-químico y bacteriológico de las aguas**. 2011b.
- LARREA-MURRELL, J.A et al. Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. **Rev CENIC Ciencias Biológicas**. 2013;44 (3):24–34.
- MUNOZ AUNION, A. El derecho internacional del agua potable y el saneamiento: Un debate de

derecho de cuarta generación en la encrucijada. **Rev. IUS**, Puebla, v. 7, n. 32, p. 176-190, dic. 2013.

OPS. Organización Panamericana de la Salud Paraguay. **Presentación de los Resultados de la Evaluación Rápida de la Calidad de Agua de los Sistemas de Agua en Redes del Paraguay** [Internet]. Asunción, Paraguay. 2019. Disponible em: https://www.paho.org/par/index.php?option=com_content&view=article&id=351:presentacion-resultados-evaluacion-rapida-calidad-agua-sistemas-agua-redes-paraguay&Itemid=214. Acesso em: 09 set. 2019.

Organización Mundial de la Salud (OMS). **Guías para la calidad del agua potable** [recurso electrónico]: incluye el primer apéndice. Vol. 1: Recomendaciones. Tercera edición. Vol. 23, 2006.

RIBEIRO, M.R.; ABREU, L.C.; ZORELLO, G. **Drinking water and rural schools in the Western Amazon: an environmental intervention study**. 2018;1–16.

RIOS-TOBON, S.; AGUDELO-CADAVID, R.M.; GUTIERREZ-BUILES, L.A. Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. **Rev. Fac. Nac. Salud Pública**, Medellín, v. 35, n. 2, p. 236-247, May 2017.

ROCHA, E.S et al. Análise microbiológica da água de cozinhas e/ou cantinas das Instituições de ensino do município de Teixeira de Freitas (BA). **Rev Baiana Saúde Pública**. 2011;34:694–705.

SOTOMAYOR, F et al. Determinación de la calidad microbiológica de las aguas de pozo artesiano de distritos de los departamentos Central, Cordillera y municipio Capital. **Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud**, Asunción, v. 11, n. 1, p. 5-14, June 2013.

Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Facultad de Química. Técnicas para la enumeración de microorganismos: análisis microbiológico del agua y de otras diversas muestras. Vol. 2. 2012. p. 1–15.

World Health Organization (WHO), Association IW. Water sanitation hygiene. Organ Mund la Salud [Internet]. 2014; 11–26. Disponible em: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_1.pdf. Acesso em: 11 out. 2019.

WWAP (Programa Mundial de Evaluación de los Recursos Hídricos de las Naciones Unidas). **Informe de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos en el Mundo 2016: Agua y Empleo**. París, UNESCO, 2016.

STURDINESS OF BAKER'S YEAST STRAINS TO NATURAL BIOACTIVE COMPOUNDS

Data de aceite: 10/12/2019

Divisão de Bioprocessos CPQBA / UNICAMP

<http://lattes.cnpq.br/3835309163911239>

Patrícia Regina Kitaka

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas
Biológicas e Agrícolas (CPQBA), Paulínia - SP,
Brazil
patricia.kitaka@gmail.com
<http://lattes.cnpq.br/8916720523524200>

Glyn Mara Figueira

Divisão de Agrotecnologia – CPQBA / UNICAMP,
Paulínia - SP, Brazil
<http://lattes.cnpq.br/3641295718619015>

Marta Cristina Teixeira Duarte

Divisão de Microbiologia – CPQBA / UNICAMP,
Paulínia - SP, Brazil
<http://lattes.cnpq.br/6011782448349535>

Cláudia Steckelberg

Divisão de Bioprocessos – CPQBA / UNICAMP,
Paulínia - SP, Brazil
<http://lattes.cnpq.br/5958009384445882>

Camila Delarmelina

Divisão de Microbiologia CPQBA / UNICAMP,
Paulínia - SP, Brazil
<http://lattes.cnpq.br/2818924682073419>

Valéria Maia de Oliveira

Divisão de Recursos Microbianos CPQBA /
UNICAMP
<http://lattes.cnpq.br/3886687872358496>

Maria da Graça S. Andrietta

ABSTRACT: Briefly, this chapter provides an overview about baker's yeast strains, more specifically about the sturdiness of different yeast strains in the face of essential oils. General aspects of plant-derived essential oils are discussed, and some applications of these substances are lightly addressed. The sturdiness of the baker's yeast strains is reported for 31 plant-derived essential oils extracted from Brazilian and exotic medicinal and aromatic plants.

KEYWORDS: *Saccharomyces cerevisiae*; Baker's yeast strains; Essential Oils; Industrial applications

ROBUSTEZ DE LINHAGENS DE LEVEDURAS DE PANIFICAÇÃO A BIOATIVOS NATURAIS

RESUMO: Este capítulo fornece, resumidamente, uma visão geral sobre as linhagens de levedura de panificação, mais especificamente sobre a robustez das diferentes cepas destas levedura na presença de óleos essenciais. Aspectos gerais dos óleos essenciais derivados de plantas são discutidos e algumas aplicações dessas substâncias são levemente abordadas. A robustez das linhagens

de leveduras de panificação é relatada para 31 óleos essenciais derivados de plantas, extraídos de plantas medicinais e aromáticas brasileiras e exóticas.

1 | BAKER'S YEASTS

In fermentation processes involving yeasts for industrial purposes, whether for the production of beverages such as beer, wine or spirits, or for the production of bread and bakery products, or in the symbiotic matrices with bacteria as kombucha or kefir, one microorganism should be highlighted: *Saccharomyces cerevisiae*.

This microorganism has shown remarkable attributes since ancient times, and plays an important role due to its versatility and capacity to act in different kinds of substrates (STRATFORD, 2006).

In the food industry, *S. cerevisiae* represent a significant part of the microorganisms employed as baker's yeast to produce bread and other bakery products in the fermentation processes. Inside this species, numerous strains are broadly used in industrial fermentation processes to produce not only bakery products, but also beer, wine, and bioethanol. Thus, it is necessary to know the characteristics of this microorganism and its behavior in different situations.

As mentioned above, *Saccharomyces cerevisiae* is widely used in different industrial segments, mainly in the food industry, in which the use of natural products free of synthetic additives has been a trend.

Recently, because of the higher demand for natural products and the development of green consumerism, plant-derived essential oils have been gaining popularity.

According to several authors, essential oils have long acted as flavoring agents in beverages and food. Besides that, they could be used as a natural source of antimicrobial compounds, and due to their versatility, they could have a great potential to replace synthetic additives as natural agents for food preservation (DEANS; RITCHIE, 1987; CONNER, 1993; BURT, 2004; RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

More recently, natural products are in the spotlight, and they have been highly valued by several industrial segments. In the food industry, their visibility has led to many studies using plant-derived essential oils focusing on antimicrobial and antioxidant properties (KUORWEL et al., 2011; KALEMBA, KUNICKA, 2003; NEGI, 2012).

Despite the amount of studies and articles concerning the application of essential oils as potential antimicrobials and as food preservatives, in the industrial segments, very few reports have demonstrated their direct application in processes which use *Saccharomyces cerevisiae*.

As referred to previously, this important microorganism is used as baker's yeast in order to produce bread and other bakery products. In addition, there are several strains with different characteristics responsible for their wide application in several industrial segments as a platform for fermentation processes.

In this study, we took a step toward exploring this question by conducting an initial

baker's yeast characterization in order to determine the sturdiness profile from different yeast strains in the face of several essential oils extracted from Brazilian native plants and also exotic plants.

For this reason, baker's yeasts were previously evaluated considering their genetic identification in a sub specific level using molecular fingerprint tools.

2 | STRAINS DIFFERENTIATION

Our study involved six microorganisms belonging to three different commercial baker's yeasts.

The baker's yeasts strains were isolated from baker's yeast samples commercially used in Brazil and all of them are identified as *Saccharomyces cerevisiae*. This yeast species has an important and strong impact in the food and beverage industries.

Firstly, all commercial baker's yeasts were grown using the spread-plating technique, in which a small sample is spread over the surface of an agar plate in order to evaluate the biotypes, i.e., we evaluated the morphology of discrete colonies formed across the surface of the WL Nutrient medium agar (WLN, DIFCO 242420).

After that, we used a streak-plating technique to check the purity of the culture of yeast. Then, single colonies, which are comprised of millions of cells growing in a cluster on an agar plate, were transferred to another plate using the spread-plate technique. Thus, the pure microorganisms were grown in petri dishes with Potato Dextrose Agar medium (PDA, DIFCO 213400) to be submitted to DNA extraction protocol (BIDENNE et al., 1992 modified; OAKLEY-GUTOWSKI et al., 1992 modified; ARGUESO, et al. 2008).

All isolates were distinguished by an electrophoretic karyotyping profile obtained from pulsed field gel electrophoresis (PFGE). This technique consists of the separation of intact chromosomal DNA according to its size on a gel matrix of agarose. According to the number and size of the chromosomes present in each strain, specific banding patterns were obtained.

In a different way to conventional DNA electrophoresis, which is able to separate molecules of up to 50 kilobases, PFGE is able to do the separation of large DNA molecules, as yeast chromosomes, which range from several hundred to several thousand kilobases (ZIMMERMAN; FOURNIER, 1996). It is possible because this technique uses an electric field that periodically changes direction in a gel matrix of agarose.

Unquestionably, nowadays there is an immense variety of molecular techniques for the identification of microorganisms. Nonetheless, not all of them are able to have sufficient sensitivity to distinguish some microorganisms at the sub-specific level, i.e., by distinguishing among different strains.

According to VILANOVA et al. (2007), PFGE has a greater discriminatory power when compared to mtDNA restriction analysis for *Saccharomyces cerevisiae* yeast

clones. Therefore, this greater resolution in the power of differentiation among strains makes it better suited for the detection of genetic diversity in yeasts.

For this reason, we used PFGE to do the differentiation of baker's yeast strains. Below we present the DNA electrophoretic profile for all baker's yeast strains evaluated (Figure 1). The terms used to name the baker's yeast groups were established based on the commercial description: (ADY Active dry baker's yeast; SDY Sweet dough baker's yeast; SY strong baker's yeast).

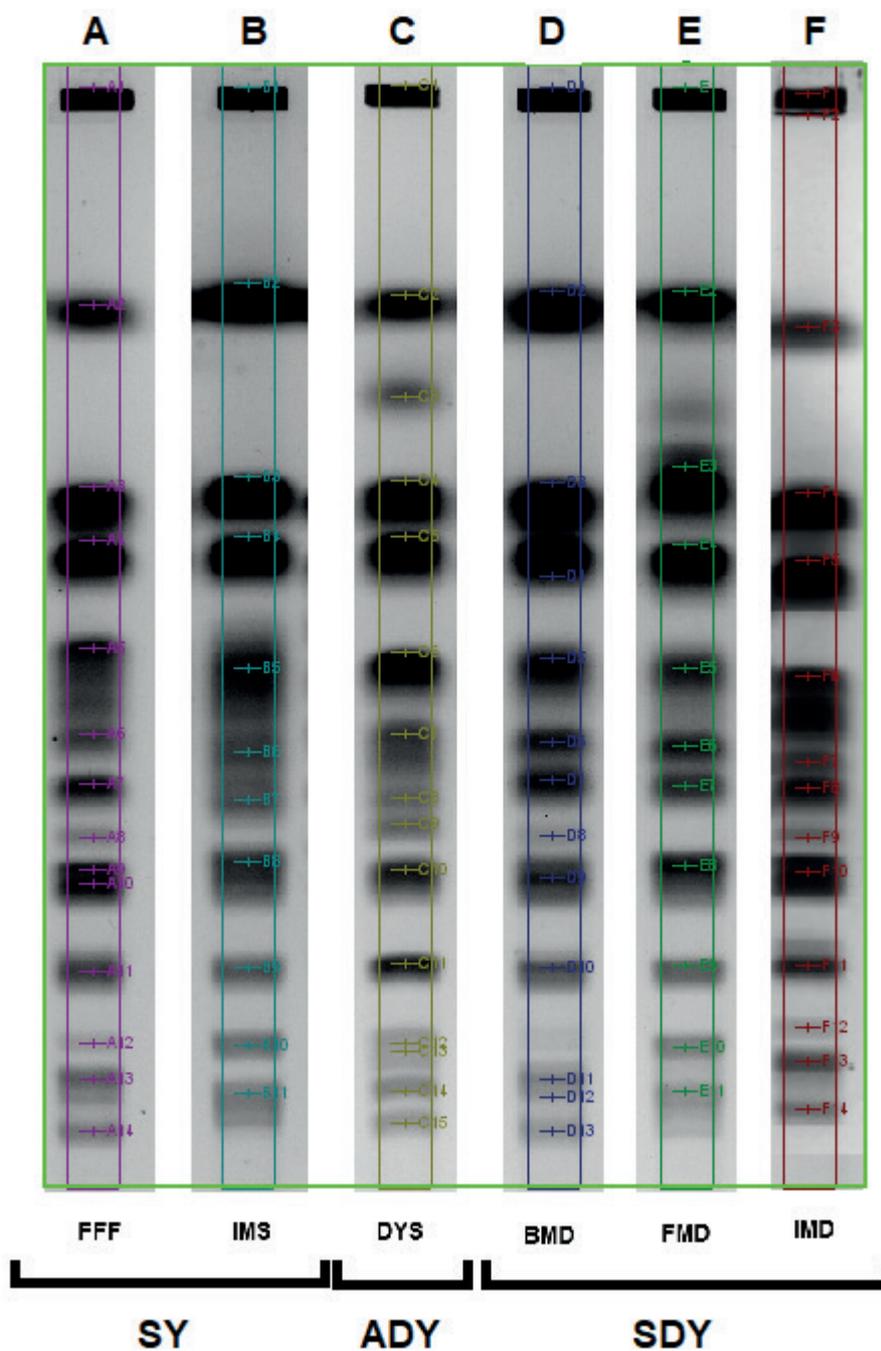


Figure 1: Genomic DNA electrophoretic profile of baker's yeast strains (*Saccharomyces cerevisiae*) obtained using PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) in agarose gel 0.8%. Image acquisition by UVP Vision Works LS system. (A) Strain FFF; (B) Strain IMS; (C) Strain DYS; (D) Strain BMD; (E) Strain FMD; (F) Strain IMD.

The differentiation among the yeast strains was established by the DNA electrophoretic profile comparison. Figure 2 illustrates the analysis results using PFGE and UVP Vision Works L.S. systems.

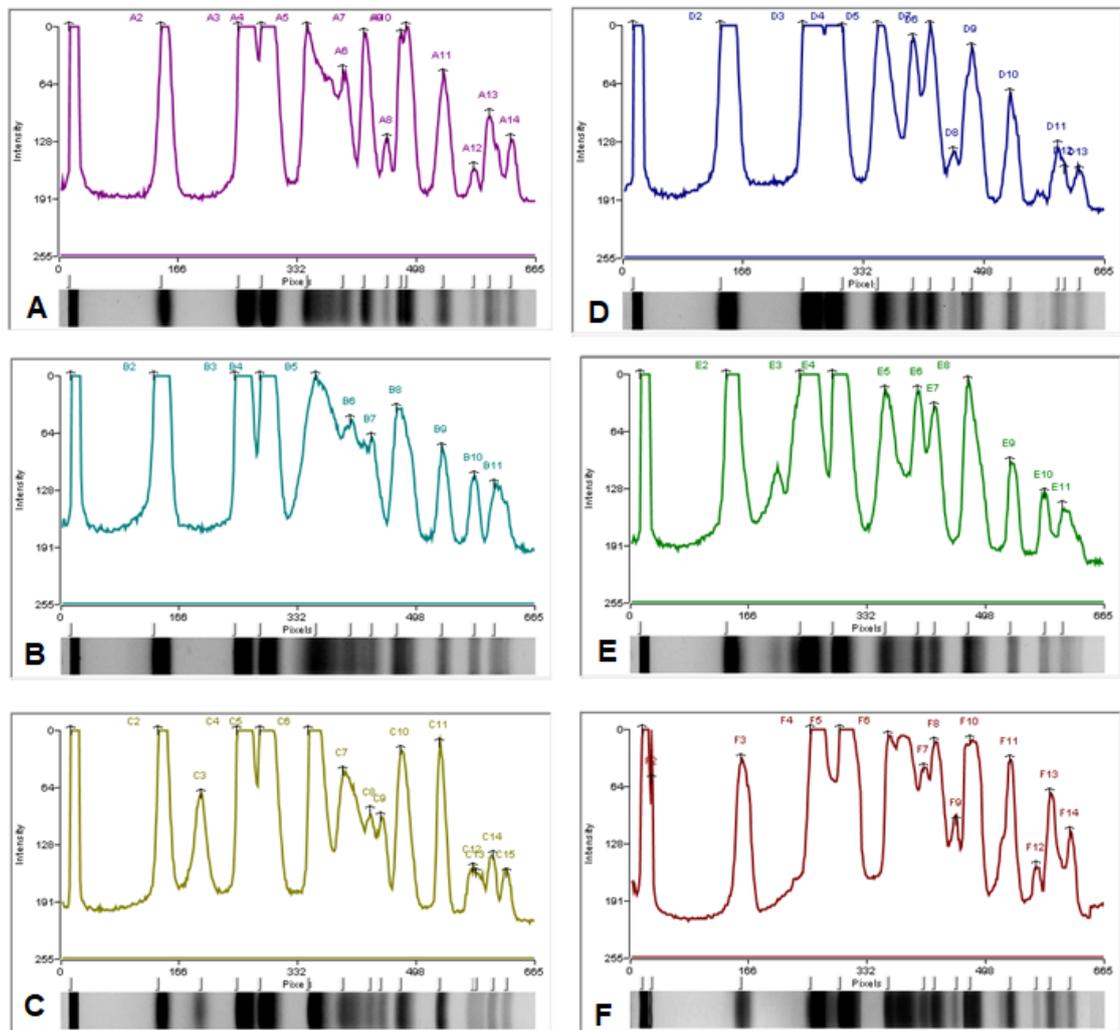


Figure 2: Differentiation among baker's yeast strains (*Saccharomyces cerevisiae*). Comparative of genomic DNA electrophoretic profile. Image acquisition and differentiation analysis system by UVP Vision Works LS. (A) Strain FFF; (B) Strain IMS; (C) Strain DYS; (D) Strain BMD; (E) Strain FMD; (F) Strain IMD.

After the PFGE analysis, six strains were identified as different yeast strains. Each one was tested with 31 plant-derived essential oils.

The next session presents some concepts about plant-derived essential oils, reveals the essential oils studied, and summarizes some findings from our studies with baker's yeast strains' sturdiness to these compounds.

3 | ESSENTIAL OILS

Recently, synthetic additives have been accused of causing toxic and carcinogenic effects, and the consumer concerns regarding healthier food options have increased. As a result, the popularity of natural products has been blasting and the demand for alternatives to synthetic food additives has gained significant market share.

Given the fact that plant-derived essential oils (EOs) contain volatile components with antimicrobial and antioxidant activities and have been used for centuries for medicinal and cosmetic purposes, as well as flavor and fragrance markets, they would be strong candidates to this replacement (HAMMER et al., 1999; HALBERSTEIN, 2005; Gurib-Fakim, 2006; MARÍN et al., 2016; Jamshidi-Kia et al., 2018).

Plant-derived essential oils are a mixture of several compounds, with different chemical origins. Their composition vary and could include terpenes, alcohols, acids, esters, epoxides, aldehydes, ketones, amines, and sulfides. These complex aromatic and volatile mixtures could be obtained from different plant materials such as leaves, flowers, buds, roots, and barks (GUENTHER, 1948; BURT, 2004). The production of these phytochemicals is mentioned by several authors as a stress response of the plants, which possess a wide range of tools to combat pathogenic infections (THEIS; LERDAU, 2003).

In addition, these complex mixtures extracted from plants have high potential to scale down the use of synthetic compounds, which are widely used by the food industry to control undesirable contaminants, since they have important properties, like antimicrobial and antioxidant actions (DEANS; RITCHIE, 1987; HAMMER et al., 1999; BURT, 2004; SARTORATTO et al., 2004; SENDRA, 2016).

In this study, 31 plant-derived essential oils were used. These essential oils were extracted from plants belonging to the Medicinal and Aromatic Plant Collection (CPMA) of the Chemical, Biological and Agricultural Multidisciplinary Research Center (CPQBA) at University of Campinas (UNICAMP), in Brazil.

The sturdiness of 6 different strains of *S. cerevisiae*, previously identified and differentiated, was established considering their capability to grow in the face of different essential oils, in all concentrations evaluated.

The sturdiness was inferred from the growing ability considering the inhibitory effect of the plant-derived essential oils (EOs) using the microdilution test and determining Minimal Inhibitory Concentration - MIC (NCCLS, 2002) for each of the 31 essential oils. Figure 3 summarizes the results from the experiments with the 31 EOs in different concentrations, in which we catalogue the resistance profiles of all baker's yeast strains studied.

Nº	Plant-derived essential oils	YEASTS					
		FFF	IMS	DYS	BMD	FMD	IMD
		SY		ADY	SDY		
1	<i>Achyrocline satureioides</i>						
2	<i>Aloysia tryphylla</i>						
3	<i>Alpinia</i>						
4	<i>Artemisia annua</i>						
5	<i>Calea pinnatifida</i>						
6	<i>Chenopodium ambroïoides</i>						
7	<i>Cymbopogon citratus</i>						
8	<i>Cymbopogon martinii</i>						
9	<i>Cymbopogon winterianus</i>						
10	<i>Cyperus articulatus</i>						
11	<i>Elionurus muticus</i>						
12	<i>Eugenia uniflora</i>						
13	<i>Lippia alba</i>						
14	<i>Lippia sidoides</i>						
15	<i>Melaleuca alternifolia</i>						
16	<i>Mentha aquatica</i>						
17	<i>Mentha piperita</i>						
18	<i>Ocimum selloi</i>						
19	<i>Ocimum gratissimum</i>						
20	<i>Origanum vulgari</i>						
21	<i>Pilocarpus pinatifolius</i>						
22	<i>Pimenta Dióica</i>						
23	<i>Piper abutiloides</i>						
24	<i>Piper aduncum</i>						
25	<i>Piper marginatum</i>						
26	<i>Piper molicomium</i>						
27	<i>Piper regnelli</i>						
28	<i>Ruta graveolens</i>						
29	<i>Schinus terebinthifolius</i>						
30	<i>Tagetes patula</i>						
31	<i>Varronia curassavica</i>						



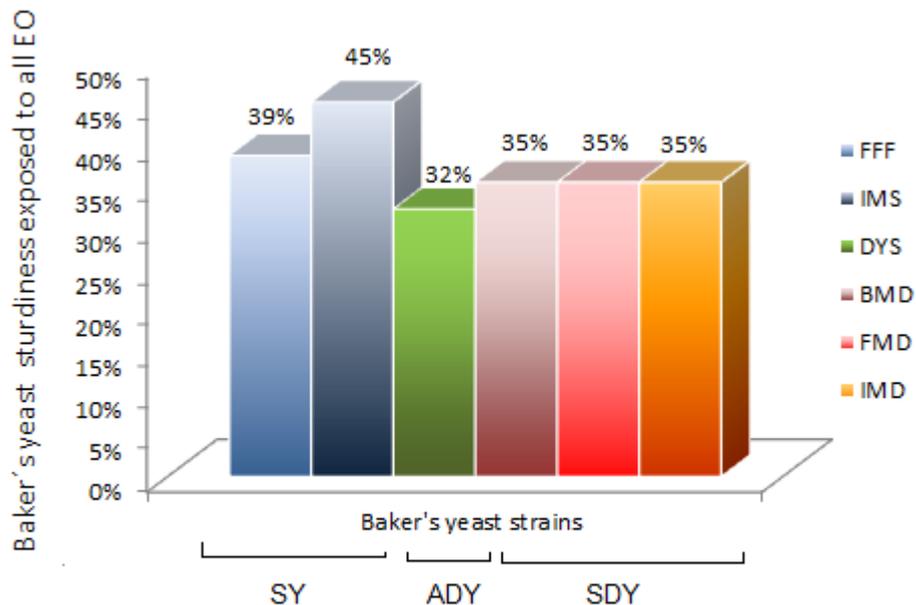
FIGURE 3 Minimal Inhibitory Concentration (MIC) - Effect of plant-derived essential oils on baker's yeast strains growth.

4 | RESULTS

The convergence among resistance or susceptibility profile comparing all strains demonstrated a similarity of 75%, considering all OE evaluated. In other words, the robustness profile differed among the 3 groups of yeasts studied for only 8 essential oils. (*Artemisia annua*; *Melaleuca aternifolia*; *Mentha aquatica*; *Mentha piperita*; *Ocimum gratissimum*; *Schinus terebinthifolius*; *Piper aduncum* and *Tagetes patula* essential oils).

Considering all EOs, the strains presented an average robustness of 35%. The strains commercially referred as Strong Yeast revealed greater sturdiness, achieving 45% for one strain and an average of 42%, comparatively (Figure 4).

Contrastingly, DYS yeast strain, belonging to Active dry yeast (ADY) group, showed the worst sturdiness pattern to all essential oils evaluated (Figure 4).



Terms used considering commercial description

ADY = Active dry yeast
 SDY = Sweet dough baker's yeast
 SY = Baker's yeast stronger

FIGURE 4 Baker's yeast sturdiness considering all essential oils evaluated.

For the groups in which two or more strains were tested, the same robustness pattern was observed in the different strains inside the same group. Interestingly, although the strains were isolated from yeasts of distinct brands/suppliers, the same standard of robustness was observed for different lineages of the same group (Figure 4).

All strains were resilient to EO of *Varronia curassavica* (sin = *Cordia verbenaceae* DC.); *Achyrocline satureioides*; *Pilocarpus pinatifolius*; *Ruta graveolens*; and several species of *Piper* sp., in all tested concentrations.

Distinctly, most of the baker's yeast strains have presented slight inhibitory growth pattern in the face of *Artemisia annua*, *Melaleuca alternifolia*, *Mentha aquatica* and *Mentha piperita* essential oils, in which concentrations can reach 0,5mg/mL.

Conversely, the essential oils extracted from: *Cymbopogon citratus*; *Cymbopogon martini*; *Cyperus articulatus*, *Elionurus muticus*; *Chenopodium ambrosioides*; *Lippia alba*; *Pimenta dióica* and *Tagetes patula*, were very harmful for all the yeasts assessed in much lower concentrations of EOs.

5 | FINAL CONSIDERATIONS

This chapter provided the characterization of several baker's yeast strains, including the genetic differentiation among strains and the establishment of the sturdiness profile using essential oils obtained from native Brazilian plants and exotic ones.

Despite the significant number of research studies of plant-derived essential oils as

potential food preservatives, antioxidants and antimicrobials, extremely few show their application in processes using *Saccharomyces cerevisiae* as fermentation platforms.

In this chapter, both the sturdiness of different baker's yeast strains in the face of several EOs and the inhibitory effect of them, were discussed.

Generally, the yeast strains' robustness presented results convergence, i.e., the same EO inhibitory effect was observed for different strains for one specific plant-derived essential oil.

Although there is a general convergence of results regarding the robustness of the strains against one specific OE, especially in the case of lineages of the same group or commercial classification, the results related to the concentrations of EO highlighted the need to evaluate sturdiness of the strains with different essential oils, even if they belong to plants of the same genus.

On the one hand, the results demonstrate that the sturdiness of baker's yeast strains distinctly vary when submitted to essential oils, but on the other hand, it is not possible to predict the effect of EO extracted from plants belonging to the same plant family or genus.

For some groups (family or genus), the results of yeast robustness point toward the same pattern. One example is the yeast strains' sturdiness presented with EOs extracted from the vast majority of plants belonging to the genus *Piper* sp. and the genus *Mentha* sp. By contrast, in other cases, the sturdiness to EOs extracted from plants belonging to the same plant genus is not necessarily similar, as EOs extracted from *Ocimum* spp plants demonstrated significant difference in the baker's yeast sturdiness profile.

Furthermore, the sensitivity profile of baker's yeast strains in the face of essential oils with a high harmful effect exhibited a more convergent outcome. One example is the inhibitory effect of EOs extracted from plants belonging to family Verbenaceae and Poaceae. EOs extracted from *Lippia* spp. (family Verbenaceae) and *Cymbopogon* spp. (family Poaceae), were very toxic for all the baker's yeast strains, presenting similar harmful effects against all of them.

In short, not only the baker's yeast sturdiness results, but also the essential oils inhibitory effect results were significant and have implications on technological applications for both the food industry and other industrial segments that use *Saccharomyces cerevisiae* strains.

Finally, these findings open new perspectives for the industrial application of bioactives as plant-derived essential oils.

6 | ACKNOWLEDGMENT

CAPES /PROEX and CPQBA/UNICAMP for financial support.

Genetics and Molecular Biology Graduate Program at Biology Institute, UNICAMP.

Bioprocess, Microbiology, Agrotechnology, Organic Chemistry/ Pharmaceuticals and Microbial Resources Divisions teams by the technical support.

REFERENCES

ARGUESO, J.L.; WESTMORELAND, J.; MIECZKOWSKI, P.A.; GAWEL, M.; PETES, T.D.; RESNICK, M.A. Double-strand breaks associated with repetitive DNA can reshape the genome. PNAS 105 (33) 11845-11850; 2008.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0804529105>

BIDENNE, C.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; VEZINHET, F. Analysis of the chromosomal DNA polymorphisms of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Curr Genet 22, 1-7. 1992.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. International Journal of Food Microbiology, v.94, n.3, p.223-253, 2004.

CONNER, D.E. Naturally occurring compounds. In Antimicrobials in Foods; Davidson, P. M., Branen, A. L., Eds.; Dekker: New York, 1993; pp 441-468.

DEANS, S. G; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. International Journal Food Microbiology 1987, 5, 165-180

GUENTHER, E., The essential Oils D. Van Nostrand, New York. 1948

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday. Molecular Aspect of Medicine n6, p1-93, 2006

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns Ann. Epidemiol. 15 686-699, 2005.

HAMMER, K.A. CARSON, C.E. RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant-extracts. J Appl. Microbiol., 86, 985-990, 1999

JAMSHIDI-KIA F, LORIGOOINI Z, AMINI-KHOEI H. Medicinal plants: past history and future perspective. J Herbmed Pharmacol. 2018;7(1):1-7. doi: 10.15171

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. Current Medicinal Chemistry, 10, 813-829, 2003.

KUORWEL, K.K.; CRAN, M.J.; SONNEVELD, K.; MILTZ, J.; BIGGER, S.W. Essential oils and their principal constituents as antimicrobial agents for synthetic packaging films. J. Food. Sci. 2011, 76, R164–R177.

MARÍN, I.; SAYAS-BARBERÁ, E.; VIUDA-MARTOS, M.; NAVARRO, C.; SENDRA, E. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of essential oils from organic fennel, parsley, and lavender from Spain. Foods 2016, 5, 18.

NEGI, P.S. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. Int. J. Food Microbiol. 2012, 156, 7–17.

OAKLEY-GUTOWSKI, K.M., HAWTHORNE, D.B., AND KAVANAGH, T.E. Application of chromosome fingerprinting to the differentiation of brewing yeasts. *Am. Soc. Brew. Chem.* v.50, p. 48–52, 1992.

RAUT, J.S.; KARUPPAYIL, S. M.. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products* 62, 250–264, 2014.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L. M.; DELARMELENA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil.. *Brazilian Journal of Microbiology, Brasil*, v. 35, n.4, p. 275-280, 2004.

SENDRA, E. Essential Oils in Foods: From Ancient Times to the 21st Century, *Foods*,5:43, 1-3, 2016.

STRATFORD M. Food and Beverage Spoilage Yeasts. In: Querol A., Fleet G. (eds) *Yeasts in Food and Beverages*. Springer, Berlin, Heidelberg 2006

THEIS, N.; LERDAU, M. The Evolution of Function in Plant Secondary Metabolites. *International Journal of Plant Sciences* 164(S3):93-102, 2003

VILANOVA, M.; ZAMUZ, S.; MASA, A.; SIEIRO, C. Evaluation of PFGE and mtDNA restriction analysis methods to detect genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated to *Vitis Vinifera* J. *Int. Sci. Vigne Vin*, 41, n°3, n°3, 155-159, 2007.

ZIMMERMANN M., FOURNIER P. Electrophoretic Karyotyping of Yeasts. In: *Nonconventional Yeasts in Biotechnology*. Springer, Berlin, Heidelberg 1996 DOI https://doi.org/10.1007/978-3-642-79856-6_3

TRENDS IN THE SCIENTIFIC PRODUCTION ABOUT PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS AND ITS MAIN TECHNIQUES OF STUDY

Data de aceite: 10/12/2019

IPTSP/UFG
dr.neto@ufg.br

Amanda Fernandes Costa

Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Goiás
Mestranda em Ciências Ambientais pelo programa Recursos Naturais do Cerrado-RENAC
Universidade Estadual de Goiás
amanda_nx26@hotmail.com

Flávia Melo Rodrigues

Programa de Pós Graduação Mestrado em Genética, Departamento de Biologia – Pontifícia Universidade Católica de Goiás; Departamento de Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Goiás, CCET- Anápolis
rflamelo@gmail.com

Felipe de Araújo Nascimento

Docente da Uni-Anhanguera (Centro Universitário de Goiás); Mestre em Genética pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás; Especialista em Educação Ambiental Urbana/ESAB; Graduação em Biologia/PUC-Goiás
fnascimentopt@hotmail.com

Benedito R. Da Silva Neto

Pós-Doutorando em Genética Molecular com concentração em Proteômica e Bioinformática. Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública pela Universidade Federal de Goiás. Mestrado em Biologia Celular e Molecular. Tem experiência na área de Microbiologia Genômica, Engenharia Genética e Quimioinformática.
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública –

TENDÊNCIAS NA PRODUÇÃO CIENTÍFICA SOBRE O FUNGO PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS E SUAS PRINCIPAIS TÉCNICAS DE ESTUDO.

ABSTRACT: The fungus *Paracoccidioides brasiliensis* is the etiological agent of *paracoccidioidomycosis* (PCM), characterized as a common systemic mycosis in Latin America and some methods are the basis of many studies on these fungi. The objective of this work was to characterize a scientific research with the use and identification of the main techniques used. A survey was conducted in the Scopus database with the keyword: “*Paracoccidioides brasiliensis*”, from 2008 to 2017. Descriptive statistical analysis and correlation test were performed. The number of studies declined over 10 years ($r = -0.8424$; $p = 0.0022$). A total of 9 authors published 25 or more articles. Medicine was the area that published the most (68.2%). The journal *Mycopathologia* stood out (8.6%). Brazil was the country with the largest number of publications (52.5%) and English was the most used languages in the studies (93%). Most studies used techniques such as PCR, Elisa, microarray among others. On average, the impact factor of the journals was 3.4 (+ -2.6). This study showed that in the last 10 years there has been a decrease in the number of

publications, but a great diversity of techniques.

KEYWORDS: Fungi, *Paracoccidioides brasiliensis*, bibliometric, scientometric.

RESUMO: O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), caracterizado como uma micose sistêmica comum na América Latina e alguns métodos são a base de muitos estudos sobre esses fungos. O objetivo deste trabalho foi caracterizar uma pesquisa científica com o uso e a identificação das principais técnicas utilizadas. Foi realizado um levantamento na base de dados Scopus com a palavra-chave: “*Paracoccidioides brasiliensis*”, de 2008 a 2017. Foi realizada análise estatística descritiva e teste de correlação. Verificou-se que o número de estudos declinou no período de 10 anos ($r = -0,8424$; $p = 0,0022$). Um total de 9 autores publicaram 25 ou mais artigos. A medicina foi a área que mais publicou (68,2%). A revista *Mycopathologia* se destacou (8,6%). O Brasil foi o país com o maior número de publicações (52,5%) e o inglês foi o idioma mais utilizado nos estudos (93%). A maioria dos estudos utilizou técnicas como PCR, Elisa, microarray entre outras. Em média, o fator de impacto dos periódicos foi de 3,4 (+ -2,6). Este estudo demonstrou que nos últimos 10 anos houve uma diminuição no número de publicações, mas uma diversidade grande de técnicas.

PALAVRAS-CHAVE: Fungo, *Paracoccidioides brasiliensis*, Bibliometria, Ciênciometria.

INTRODUCTION

Fungal diseases are constantly underestimated by the Brazilian population. Patients with these types of diseases have a variety of clinical manifestations that pose a challenge in diagnosis and treatment. The fungi comprise an extremely diverse and cosmopolitan microbial group with a wide variety of morphologies, metabolisms and habitats^{1,2}.

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a common systemic mycosis in Latin America, considered a neglected tropical disease⁴⁻⁵. The fungi *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* are the etiological agents of PCM, the most present endemic fungal infection in Latin America, with Brazil, Colombia and Venezuela are the main countries in number of cases^{6,7}. In Brazil PCM was already confirmed in 27% of cities and was classified in eighth place in ranking of causes of death by infectious and parasitic diseases⁸.

The main group affected by the disease are usually adult male farm workers who present the chronic clinical form of the disease, although the acute form mainly affects children or young adults accounting for 5-10% of cases⁹. The predominance of men infected with PCM by women occurs due to the hormonal protective effect of estradiol present in women capable of blocking the transformation of mycelia or conidium into the infecting yeast form¹⁰. PCM treatment still presents enormous challenges, with frequent relapses and debilitating sequelae.

Molecular methods are important to the studies about this fungus, because

allow to confirm the etiology of the disease through specific DNA fragments. Among these methods, polymerase chain reaction (PCR) and Nested PCR stand out¹¹. These methodologies based on PCR assays have been used to detect *P. brasiliensis* both from culture¹² and from clinical samples¹¹. They are useful for diagnosis, meeting the requirements of sensitivity (proportion of truly positive individuals among patients), specificity (proportion of truly negative or normal individuals among nonpatients), and speed¹³.

The RAPD technique has been widely used to reveal important intrinsic and extrinsic characteristics of *P. brasiliensis*^{14,15}. The genomic organization of *P. brasiliensis* has been investigated using the gel technique in pulse-field gel electrophoresis (PFGE)¹⁶.

There are several techniques of molecular biology that help in the study of this systemic fungus. The fungi *P. brasiliensis* and *P. lutzii*, as previously described, are thermodynamorphic fungi that undergo a change in their temperature-dependent morphology and this characteristic favors their establishment in the host, is the causative agent of a human systemic mycosis that affects mainly rural workers in the productive age range of their lives⁹. In Brazil, this disease has been considered a serious public health problem⁹. The identification and characterization of this fungus have been object of studies of many researchers who seek to better understand the biology of this pathogen.

This work intends to contribute to a better knowledge of the situation of studies on the fungus quantitatively and qualitatively. Therefore, the objective of this study is to analyze the bibliometric study of articles that discuss about *P. brasiliensis* and its most used techniques.

MATERIAL AND METHODS

The literature review of the work involving the study of *P. brasiliensis* and biology techniques was carried out using the Scopus database (<https://www.scopus.com/>). In this research, the following keywords were searched: *Paracoccidioides brasiliensis*, in the title of the article, abstract and keywords, allowing data from various sources such as journals, periodicals, books and others. The delimited period was about 10 years, being in the period from 2008 to 2017, that is, all studies published and available on the Scopus site were collected in this period. We selected the publications that dealt with the subject studied. The following data were collected in the studies: (1st) name of the first author; (2nd) year of publication; (3rd) area of knowledge; (4th) name of the journal; (5th) country and the institution of the 1st author; (6th) language; (7th) name of the first author; (8th) type of article; (9th) IF / year ratio, IF / citations and publication year and citations. The IF of the articles used in the analyzes will be obtained from the Journal Citation Reports (JCR) (<http://www.bioxbio.com/if/>).

After the studies were taken, all abstracts were read in order to exclude possible

articles that do not deal with the theme and to select the techniques used. The data were then tabulated. Qualitative variables were analyzed by means of descriptive statistics and represented in graphs and tables. To verify if there was an increase in the Impact Factor over the years, a correlation analysis was done, the same for impact factor and citations and for citations per year. All analyzes were performed in the Bioestat program 5.0 (AYRES et al., 2007) and a significance level of 5% ($p \leq 0.05$) was adopted. The Excel 2007 program was used to prepare the graphs.

RESULTS

According to the survey, 754 papers were published in the period from 2008 to 2017. The number of publications decreased in a highly significant way over the years ($r = -0.8424$; $p = 0.0022$), with 2016 having the lowest number (60) and a peak in the year 2008 (90 articles) (Figure 1).

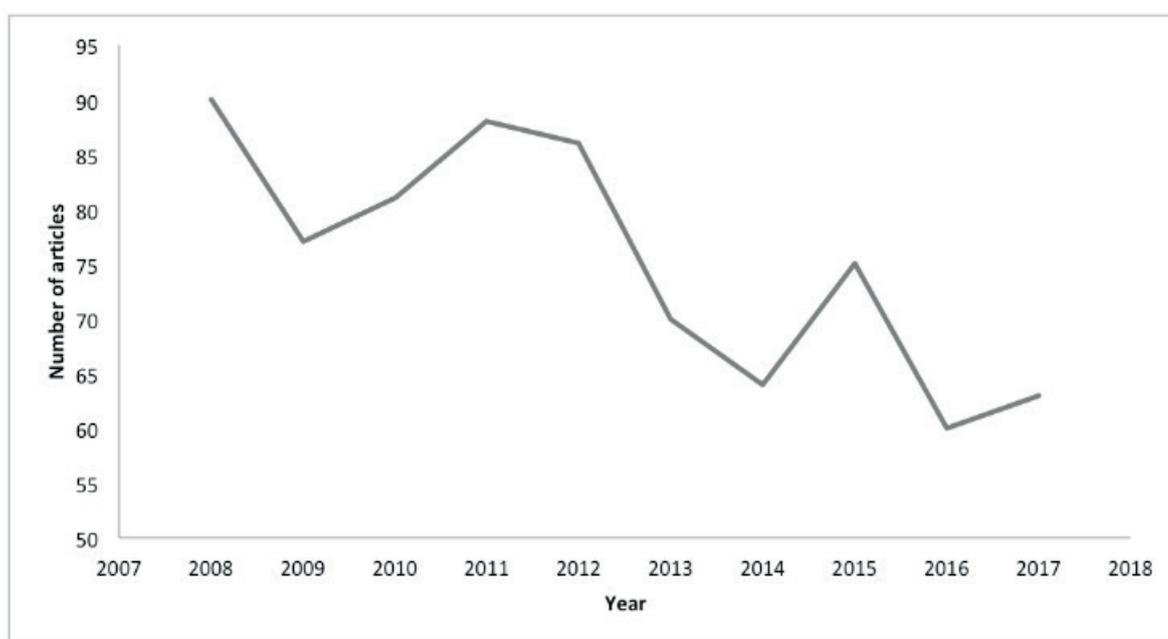


Figure 1. Number of articles published over 10 years ($r = -0.8424$; $p = 0.0022$).

It was observed that 161 different journals published on the subject studied. However, only thirteen journals obtained a number of publications equal to or greater than 10 papers, making a total of 331 articles, corresponding to 44% of publications (Table 1). Regarding the studies on the fungus *P. brasiliensis*, of the journals with a high rate of publication, it can be observed that *Mycopathologia* published 65 articles, corresponding to a total of 8.6% of the publications analyzed.

Journals	N	%
<i>Mycopathologia</i> (IF: 1,47)	65	8,6
<i>Medical Mycology</i> (IF:2,79)	58	7,7
<i>Plos One</i> (IF: 2,76)	36	4,8

Plos Neglected Tropical Diseases (IF: 4,36)	34	4,5
Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz(IF: 2,83)	23	3
Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical (IF: 1,35)	20	2,6
Microbes And Infection (IF:2,92)	19	2,5
Frontiers In Microbiology (IF: 4,02)	16	2,2
Fungal Genetics And Biology (IF: 3,47)	15	2
Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo (IF: 1,49)	13	1,7
Mycoses (IF: 2,79)	12	1,6
Infection And Immunity (IF: 3,25)	11	1,4
American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene (IF: 2,56)	10	1,3
Journals with less than 10 articles	424	57
Total	755	100

Table 1. Periodicals with the highest number of publications on the *P. brasiliensis* fungus from 2008 to 2017

The articles were published in different scientific areas according to the Scopus classification, with the most published articles related to the researched subject in the analyzed period were: Medicine (68.2%) and Immunology and Microbiology (42%). Of the 151 different authors who published the articles analyzed in the present survey, 9 published twenty-five or more articles on the fungus *P. brasiliensis* between 2008 and 2017. These 9, together, represented a total of 33.7% of all publications, being that Travassos, LR, McEwen, JG published 25, Puccia, R., 25 articles, De Almeida Soares, CM, Taborda, CP, and Bagagli, E. published 28 articles, Camargo, ZP, Restrepo, A. 31, and by end Felipe, MSS published 33 articles.

Brazil has the highest number of publications ($n = 363$), followed by the United States ($n = 116$), Colombia ($n = 60$), Venezuela ($n = 22$), Spain and United Kingdom ($n = 19$), Portugal (18), Japan (13), France and Mexico (12), Argentina (11), Germany and Italy Canada and China (5) (Figure 2).

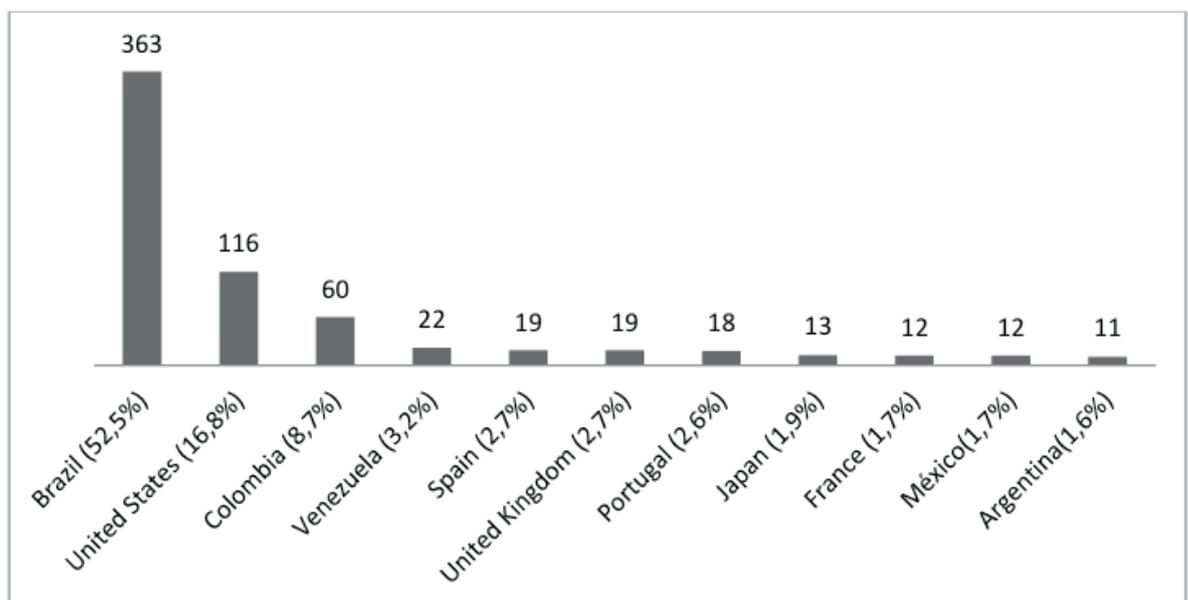


Figure 2. Countries with the highest number of publications on the relationship verified in the

period from 2008 to 2017.

Regarding the language used in the writing of scientific articles, it was observed that English predominated with 718 published articles, making up approximately 93% of all publications. About the impact factor in relation to the year of the journals studied, an average value of 3.4 (± 2.6) was found, varying from 0.04 to 19.95 (Figure 3). There was a significant correlation between the IF and the year ($r = 0.1007$ and $p = 0.0064$). As for the correlation between citation and year it was observed that the number of citations decreased in the last 10 years ($r = -0.351$, $p = <0.0001$).

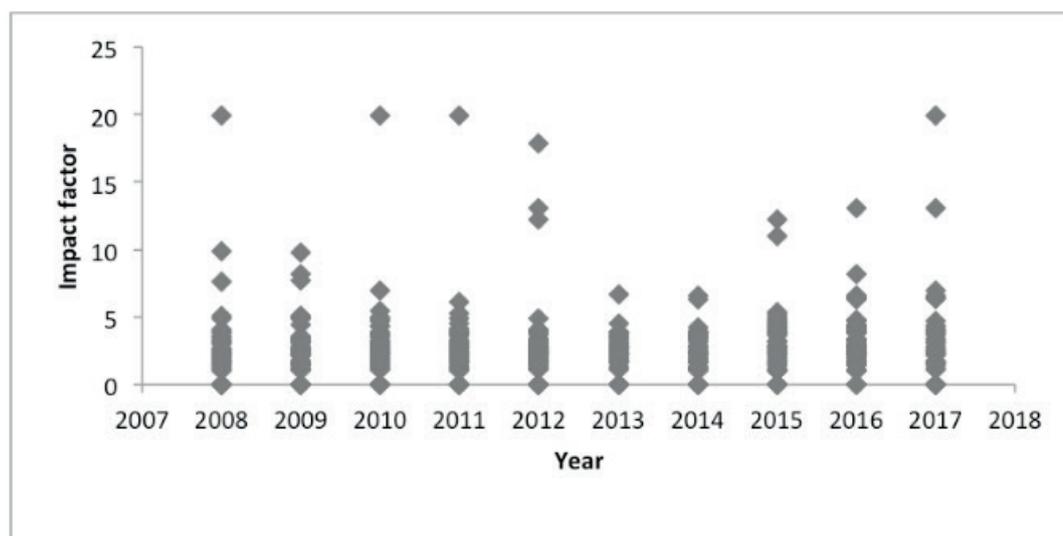


Figure 3- Correlation of impact factor of the journals that published on the *P.brasiliensis* fungus and the year.

In order to identify the main techniques used in the studies (Figure 4), all abstracts were read. In 183 of the 754 papers, the technique was not specified in the abstract and they were categorized as unidentified, representing 25%. Most of the studies used several techniques to compose the work, among them were: Elisa, spectrophotometry, cytometry, among others (26%), followed by reviews (14%), Case report (13%), %, Microscopy (2.8%), Elisa (2.6%), Bioinformatics (2.1%), Proteomics (1.85), among others.

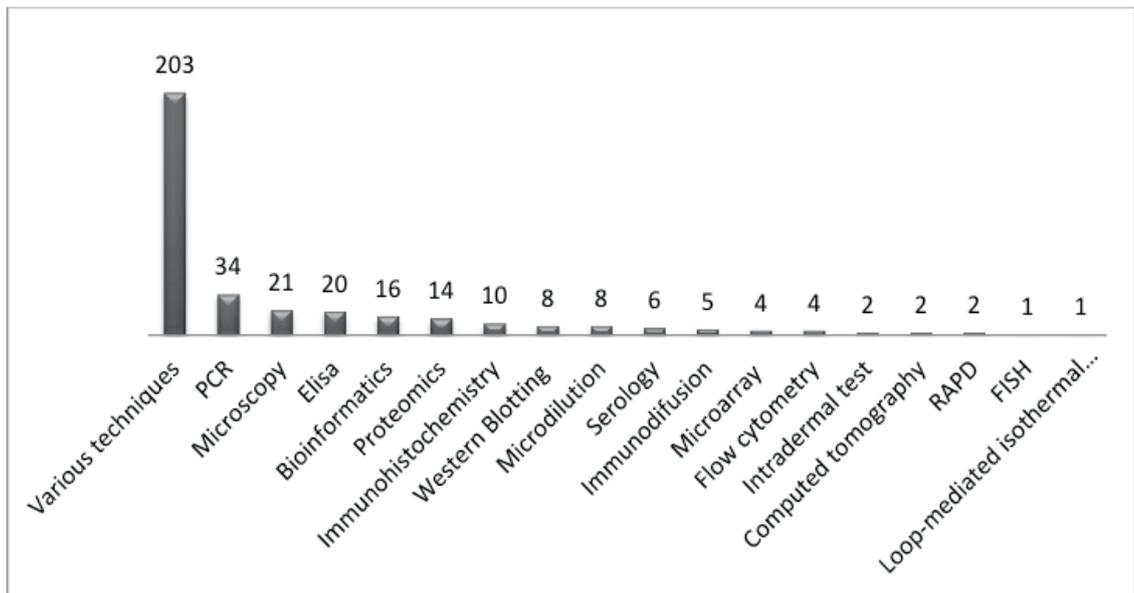


Figure 4. Main techniques used in fungus study.

DISCUSSION

PCM is a human systemic mycosis, the etiologic agent of which is *P. brasiliensis* and *P. lutzii*, a dimorphic term fungus that promotes a chronic inflammatory granulomatous disease¹⁷. According to the number of publications has declined in a highly significant way over the years ($r = -0.8424$; $p = 0.0022$). A larger number of publications were expected since this mycosis represents a major Public Health problem due to its high disabling potential and the number of premature deaths that it causes, especially for specific social segments, such as rural workers, who, more than anything else this presents great deficiencies of access and support of the network of the health services favoring the late diagnosis⁶.

Journals, electronic or printed, are still considered the fastest and most economically way for researchers to circulate and make visible the results of their work¹⁸. It was observed that 161 different journals published on the subject studied. However, only thirteen journals obtained a number of publications equal to or greater than 10 papers, making a total of 331 articles, corresponding to 44% of publications. *Mycopathologia* is an international journal dedicated to the study of the role of fungi in human and animal diseases, publishes original articles and case reports and in fungal systematics and taxonomy¹⁹. Both the first and the others that compose the table of those who published the most are interested in research on fungi and neglected diseases, which justifies this result. It is worth emphasizing the current policy of publications of the international journals that apply fees for the articles to be made available in the open access format, making them more accessible, however, we must alert to the political / social problem that the underdeveloped countries face due to the low investment in science, making few able to make their publications open to all audiences. Another important point within the journals is the highlight for the three Brazilian periodicals that

appear among the thirteen that published the most.

Several subareas of health are interested in the subject and study, this happens because the mycosis is related to aspects ranging from the immunological to the social aspects. In relation to the study area Medicine is far ahead of the others in a number of publications, which is easy to understand considering that the fungus under study causes PCM that is considered a neglected tropical disease^{4,5} and represents a public health problem causing morbidity and mortality²⁰. This justification also applies to the large number of publications in the areas that succeed in medicine such as Immunology and Microbiology, Biochemistry, Genetics and Molecular Biology that are dedicated to studying the pathways of fungus survival and understanding the organism.

Of the 151 different authors who published the articles analyzed in the present survey, 9 published twenty-five or more papers on the fungus. The author with the highest number of publications Felipe, M.S.S. is linked to the Catholic University of Brasília that does not appear among the Universities that published twenty or more studies, but this can be explained by the partnerships between the institutions, so this author can produce much even if his institution does not appear in the ranking. Already the author Restrepo, A. that appears in second place is linked to Corporation for Biological Investigations that appears among the institutions with many publications, this relation can be applied to almost all the authors that more published being linked to the Federal University of São Paulo, Minas Gerais and Goiás, USP, among others²¹.

The increase in scientific production in Brazil, which currently occupies the 13th place in the world position, can be justified by the investment in postgraduate studies. The numbers show that from 1996 to 2011 there was an increase in the number of masters and doctors, from 13.5 thousand to 54.6 thousand (42.2 masters and 12.2 doctors)¹⁸. In the table of the countries that published the most about Brazil appears with the largest number of publications (n = 363).

It was noted that the ten countries that most published articles are equivalent to approximately 87% of all publications. Brazil has stood out in relation to other countries in terms of number of publications, which can be explained by the fact that the fungus is the most endemic in Latin America, Brazil, Colombia and Venezuela being the main countries in the number of cases^{6, 7}. In Brazil, PCM was classified as a cause of frequent death due to chronic diseases or recurrent infectious and parasitic diseases, ranking eighth and confirmed in 27% of municipalities⁹. It is important to point out that countries like Colombia and Venezuela that are also endemic centers of the disease published much less than Brazil, which shows the effort of the Brazilian researchers with the studies in this theme.

Science is international and new knowledge must belong to everyone. The regionalization of knowledge has lost a lot of force in recent decades, and the emergence of the internet and electronic scientific journals has spread the knowledge produced anywhere in the world. On the other hand, language has emerged as a barrier for many researchers²². English was the predominant language (93%). Although the country with

the most publications was Brazil, the language of prevalence was English, this is due to the tendency to accept English as the “science’s language” and the greater visibility that the work achieves when English is used²³.

The Impact Factor of scientific journals is one of the instruments that has the function of measuring the quality of existing publications, and its objective is to gauge the scientific product of the authors, the quality of the publications and to classify the scientific journals inserted in the JCR of the ISI. The impact factor had an average value of 3.4 (\pm 2.6), ranging from 0.04 to 19.95. The journal with the largest number of publications, Mycopathology, has an IF of 1.71, which is below the average IF. In addition to this, most of the journals that published the most, such as Medical Mycology and Plos One, also had a below-average IF (2.37 and 2.80, respectively). This index is obtained by dividing the number of citations of the articles of a journal in all journals inserted in the ISI database, divided by what was published by this journal in the previous two years²⁴. As it was verified, the impact factor has increased over the years, which means that the quality of the publication on the theme has been improved over the last 10 years.

Regarding the techniques of study with the largest number of publications using various techniques is explained why the combination of different theories, methods and data sources can help overcome the natural bias that reaches the studies with unique approaches²⁵. We have also found a large number of case studies which are especially useful in qualitatively detecting novelties, although they do not wish to be quantified²⁶. In addition to the molecular biology techniques used as PCR, Western Blotting represent a large part of the work, because in the last decades there has been a significant increase in the development of molecular techniques for the detection, identification and characterization of microorganisms. Advances in molecular biology studies have led to the development and use of various molecular typing methods²⁷. With special attention to Proteomics, some factors favored its rapid development and widespread use today as the explosion of the sequencing of some pathogenic organisms and the advancement of protein characterization techniques, this methodology aims to identify the proteins and to show where they are located in the cell, showing how they behave according to environment, internal or external stimulus²⁸. Proteomics have gained attention since it was revealed that the genome consists of few genes²⁹.

CONCLUSION

It was observed that there was no trend of increase in the number of publications during the 10 years (2008 to 2017) and that there was even a highly significant decrease of publications in this period. The authors who published the most are from Brazil, justified because it is an endemic fungus, but there was predominantly of English language in the writing of the same ones. The average impact factor of the reviewed journals was 3.2. In the various types of studies carried out, there are the

predominance of publications that use several techniques to compose the study and if the publications that use techniques of molecular biology are composed, it compiles a great part of the work. Therefore, there is an interdisciplinary interest in the study of the fungus, this fact is worrisome since already mentioned that the disease caused by the fungus is classified in eighth place in a ranking of causes of death frequent due to chronic diseases or recurrent infectious and parasitic diseases.

REFERÊNCIAS

- Giacomazzi, J et al. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, v. 59, n. 3, p. 145-150, 2016.
- Bongomin, F et al. Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. **Journal of fungi**, v. 3, n. 4, p. 57, 2017.
- Matute, DR. et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Molecular biology and evolution**, v. 23, n. 1, p. 65-73, 2005.
- WHO Department of Control of Neglected Tropical Diseases. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: World Health Organization, 2013. http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564540/en/ (accessed May 15, 2017).
- Queiroz-Telles F, Fahal AH, Falci DR, Caceres DH, Chiller T, Pasqualotto AC. Neglected endemic mycoses. *Lancet Infect Dis.* (17)30306-7. 2017.
- Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL, Queiroz-Telles F, Kono ASG, Paniago AMM, Nathan A, Valle ACFD, Bagagli E, Benard G, Ferreira MS, Teixeira MM, Silva-Vergara ML, Pereira RM, Cavalcante RS, Hahn R, Durlacher RR, Khoury Z, Camargo ZP, Moretti ML, Martinez R.. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017; 50(4):1-26.
- Martinez R. Epidemiology of Paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 57: 11–20. 2015.
- De Carvalhosa, AA et al. Paracoccidioidomycosis prevalence in a public laboratory of the Brazilian unified health system. **Journal of Oral Diagnosis**, v. 1, n. 1, p. 1-1, 2016..
- Paniago AM, Ivan J, Aguiar A, Aguiar ES. Paracoccidioidomycosis: a clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop.* 36: 455–459. 2003.
- Pinzan CF, Ruas LP, Casabona-Fortunato AS, Carvalho FC, Roque-Barreira MC. Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *PLoS One.* 5:e10757. 2010.
- Buitrago PMJ, Merino S, Puente A, Gomez-Lopez A, Arribi RM, Zancopé-Oliveira MC, Gutierrez JL, Rodriguez-Tudela M, Cuenca-Estrella. Utility of Real-time PCR for the detection of *Paracoccidioides brasiliensis* DNA in the diagnosis of imported paracoccidioidomycosis, *Med Mycology*, 2009; 47:8(1), 879–882.
- Motoyama AB, Venâncio EJ, Brandão GO, Petrofeza-Silva S, Pereira IS, Soares CM, Felipe MS. Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR amplification of ribosomal DNA. *J Clin Microbiol*, 38 (8): 3106-3109, 2000.
- Cisalpino SP, Travassos LR. Application of molecular biology to the characterization and identification

of fungi and to the diagnosis of fungal infections. In: *Treaty of Medical Mycology* Lacaz. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM & Takahashi MN. Sarvier Editora de Livros Médicos, São Paulo, 2002.

Motta TR, Moreira-Filho CA, Mendes RP, Souza LR, Sugizak MF, Baueb S, Calich VLG, Vaz ACA. Evaluation of DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers (RAPD) as genetically associated elements to differentiate virulent and non-virulent *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 33: 151-157, 2002.

Hahn RC, Macedo AM, Fontes CJF, Batista RD, Santos NL, Hamdan JS. Randomly amplified polymorphic DNA as a valuable tool for epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol*. 41(7): 2849-2854, 2003.

Richini-pereira VB, Bosco SD, Griese J, Theodoro RC, Macoris SA, Da Silva RJ, Barrozo L, Tavares PM, Zancoppe-Oliveira RM, Bagagli, E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. *Med Mycol*: 1-6, 2007.

Ramos ESM, Saraiva LE. *Paracoccidioidomycosis*. *Dermat Clin*.26:257-69. 2008.

Brofman PR. The Importance of Scientific Publications. *Cogitare Enferm*. 17(3):419-21. 2012.

Mycopathologia. Springer link. Disponível em: <<https://link.springer.com/journal/11046>>. Acesso em: 15 nov. 2018.

Vallabhaneni S, Mody RK, Walker T, Chiller T. The global burden of fungal diseases. *Infect Dis Clin North Am*. 30: 1–11. 2016.

PUBMED [INTERNET]. Acesso em: [2016 AGO 06]. Disponível em:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.

Volpato G. Scientific publication. *Academic Culture*. 3ª ed. São Paulo. 2008.

Forattini OP. The tongue of science. *Cad Saude Publica*. 31(01): 3-8. 2008.

Ruiz MA, Greco OT, Braille DM. Impact factor: importance and influence in the editorial, academic and scientific environment. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 24(3): 273-278. 2009.

Paranhos R, Filho DBF, Rocha EC, Júnior JAS, Freitas D. An introduction to mixed methods. *Sociologia*. 2016.

Vandenbroucke JP. Case reports in an evidence-based world. *JRSM*. 92:159-63. 1999.

Ferández-Cuenca F. Applications of PCR techniques to the molecular epidemiology of infectious diseases. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 22: 355-360, 2004.

Rezende TC, Borges CL, Magalhães AD, de Sousa MV, Ricart CA, Bailão AM, Soares CM. A quantitative view of the morphological phases of *Paracoccidioides brasiliensis* using proteomics. *J Proteomics*. 21;75(2):572-87. 2011.

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn

P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigó R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X.. The human genome. *Science*. 291:1304-1351. 2001.

UMA ABORDAGEM SOBRE PRODUÇÃO DE XILANASES PELO FUNGO *Thermomyces lanuginosus* UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO INDUTOR

Data de submissão: 12/11/2019

Data de aceite: 10/12/2019

Andreza Gambelli Lucas Costa Nascimento

Universidade Estadual do Oeste do Paraná,
Cascavel, Paraná, Brasil.

Link para o Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9770691189596665>

Carla Lieko Della Torre

Universidade Estadual do Oeste do Paraná,
Cascavel, Paraná, Brasil.

Link para o Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0141810773760829>

Marina Kimiko Kadowaki

Universidade Estadual do Oeste do Paraná,
Cascavel, Paraná, Brasil.

Link para o Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1819723253019762>

RESUMO: Os fungos são microrganismos largamente utilizados na produção principalmente de produtos de interesse biotecnológicos. Dentre os fungos filamentosos, o *Thermomyces lanuginosus* é um organismo termófilo que apresenta características em sua estrutura celular que lhe confere resistência em temperaturas elevadas e capacidade de secretar vários tipos de enzimas termoestáveis ao meio extracelular. A enzima xilanase, pertencente ao grupo glicosil hidrolase, é produzida por

este fungo e ela apresenta a propriedade de clivar as ligações β -1,4 de hemiceluloses da parede celular presente em biomassas lignocelulósicas. As hemiceluloses encontradas nos resíduos agroindustriais são constituídas principalmente de xilanas, que são hidrolisadas pelas enzimas xilanásicas. Essa reação de clivagem da xilana produz açúcares redutores denominados xilo-oligosacarídeos (XOS) como xilopentaose, xilotetraose, xilotriose, xilobiase e o monossacarídeo D-xilose. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo descrever sobre a produção de enzimas xilanolíticas pelo fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus*, utilizando resíduos agroindustriais como indutor, no sentido de contribuir para que novos estudos possam ser realizados com fungos produtores de enzimas, e assim, incorporar tecnologias mais limpas no futuro em diferentes setores industriais.

PALAVRAS-CHAVE: agro resíduo; complexo xilanolítico, fungo termófilo, hemicelulose; *Thermomyces lanuginosus*.

AN APPROACH TO XYLANASE PRODUCTION BY *Thermomyces lanuginosus* USING AGRO-INDUSTRIAL RESIDUE AS INDUCER

ABSTRACT: Fungi are microorganisms widely used in the production mainly of products of biotechnological interest. Among the

filamentous fungi, *Thermomyces lanuginosus* is a thermophilic organism that presents characteristics in its cellular structure of resistance at elevated temperatures and ability to secrete several types of thermostable enzymes to the extracellular environment. The enzyme xylanase, belonging to the group glycosyl hydrolase, is produced by this fungus and it has the property of cleaving the β -1,4 bonds of cell wall hemicelluloses present in lignocellulosic biomass. The hemicelluloses found in agroindustrial residues are mainly composed of xylans, which are hydrolyzed by xylanase enzymes. This xylan cleavage reaction produces reducing sugars called xyloligosaccharides (XOS), such as xylopentaose, xyloetraose, xylotriose, xylobiose and the monosaccharide D-xylose. In this context, this study aimed to describe the production of xylanolytic enzymes by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* using agroindustrial residues as inducer, in order to contribute to further studies with enzyme producing fungi, and thus incorporate cleaner technologies in the future in different industrial sectors.

KEYWORDS: agro residue; xylanolytic complex, thermophilic fungus, hemicellulose; *Thermomyces lanuginosus*.

1 | INTRODUÇÃO

Os resíduos agroindustriais que são produtos do processamento de grãos oriundos de atividades agrícolas do campo apresentam em sua composição estrutural a celulose, hemicelulose e lignina (BASU; KUMAR; SHUKLA, 2018). Essa hemicelulose que forma a parede celular secundária do vegetal é constituída de xilana, um heteropolissacarídeo, que pode ser hidrolisado pelas enzimas xilanásicas dos microrganismos para obtenção de energia (SHRIVASTAVA et al., 2016).

Os fungos são microrganismos amplamente encontrados na natureza, e atualmente são utilizados em diversos setores industriais, para obtenção principalmente de produtos de interesse biotecnológicos (KUMAR; CHHABRA; SHUKLA, 2017). Dentre os fungos filamentosos, os termófilos apresentam características em sua estrutura celular que lhe conferem a propriedade de se manter estável em temperaturas elevadas, e conseqüentemente secretar enzimas termoestáveis em meio extracelular (SHI et al., 2019).

As xilanases, uma das classes de enzimas que pertencem ao grupo das glicosil hidrolases (GH), são produzidas por diversas espécies de microrganismos (FROCK; KELLY, 2012). Apresentam a característica de clivar ligações β -1,4 de xilana das hemiceluloses da parede celular vegetal presente em biomassas lignocelulósicas (KOLENOVÁ; VRŠANSKÁ; BIELY, 2006). A reação de clivagem da xilana pelas enzimas catalíticas produzem açúcares redutores denominados xilo-oligossacarídeos (XOS). Estes XOS apresentam ação prebiótica, uma propriedade que a molécula tem de auxiliar na melhora do sistema gastrointestinal e aumentar a imunidade do organismo (FARIAS et al., 2019).

Nesse sentido, o presente trabalho teve como proposta abordar sobre o uso

de resíduos agroindustriais como indutor para produção de enzimas xilanólíticas pelo fungo termófilo *Thermomyces lanuginosus*, e assim, contribuir para que novas pesquisas possam ser realizadas com fungos produtores de enzimas. Além disso, buscar aplicabilidades biotecnológicas para incorporar tecnologias mais limpas que colaboram e trazem benefícios na redução de custos de bioprocessos industriais, bem como minimizar impactos ambientais.

2 | RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO FONTES DE CARBONO PARA PRODUÇÃO DE XILANASES

Países em desenvolvimento cujo PIB (Produto interno bruto) depende essencialmente do setor primário, isto é, agricultura, mineração e extração vegetal, tem que lidar com grandes quantidades de resíduos agrícolas gerados a partir do processo de colheita destes grãos (MELO, et al., 2011) são produzidas milhões de toneladas de resíduos provenientes do processamento agroindustrial. Muitos deles são ricos em compostos bioativos sendo potenciais fontes naturais dessas substâncias. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o teor de compostos fenólicos totais, a atividade antioxidante e a composição fenólica de três resíduos gerados por agroindústrias brasileiras: bagaço de uva Isabel (BI. Com o crescimento da agricultura cada vez mais industrializada, quantidades enormes de resíduos de origem vegetal constituídos por componentes que formam o complexo de lignocelulose são gerados no âmbito mundial e conseqüentemente, acabam acarretando um grande problema ambiental (BRIENZO, 2010; OKAFOR et al., 2007).

Uma quantidade significativa de biomassa hemicelulósica está presente nos resíduos agrícolas, que consiste de vários polímeros de carboidratos, como xilana, manana, galactana entre outros. E dentre eles a xilana ocupa um lugar de destaque (BASU; KUMAR; SHUKLA, 2018; SHRIVASTAVA et al., 2016).

As plantas consideradas madeiras duras são os maiores reservatórios de xilana, um polissacarídeo não celulósico abundante que confere cerca de 20 a 35% do peso seco total na biomassa vegetal (JIANG et al., 2010; SHARMA, M.; KUMAR, A., 2013), sendo assim, o componente principal hemicelulósico da parede celular secundária e intermediário entre a lignina e outros polissacarídeos (GHOSH; SUTRADHAR; BAISHYA, 2019).

A xilana é amplamente encontrada em resíduos agroindustriais como o sorgo, bagaço-de-cana, bagaço de cevada, palha de milho, farelo de arroz e trigo (KUMAR; CHHABRA; SHUKLA, 2017). Depois da celulose, a xilana é o segundo polímero mais abundante de fonte de carbono orgânico renovável, se ligando covalentemente a resíduos de lignina e polissacarídeos, como a pectina e a glucona (GHOSH; SUTRADHAR; BAISHYA, 2019).

A despolimerização dessas lignoceluloses encontrados nos resíduos está relacionada com a versatilidade dos microrganismos em secretar enzimas específicas

a estes substratos complexos (ZHANG et al., 2015). Desse modo, na tabela 1 estão elencados os estudos realizados por diversos pesquisadores utilizando diferentes resíduos agroindustriais como fontes de carbono para induzir a produção de enzimas xilanolíticas por fungos do gênero *Thermomyces*.

Fontes de carbono	Fungo	Referências
Bagaço de cana de açúcar	<i>T. lanuginosus</i> Sigma®	SOUZA et al., 2018
Bagaço de cana de açúcar	<i>T. lanuginosus</i> SSBP	MANIMARAN et al., 2009
Bagaço de cana de açúcar	<i>T. lanuginosus</i> S1, S3 e FZ1	ROSA, 2014
Farelo de trigo	<i>T. lanuginosus</i> NCIM 1374	SHRIVASTAVA et al., 2016
Farelo de trigo	<i>T. lanuginosus</i> DSM 28966	SHRIVASTAVA et al., 2016
Farelo de trigo	<i>T. lanuginosus</i> SS-8	SHRIVASTAVA et al., 2013
Farelo de trigo	<i>T. lanuginosus</i> 195	GAFFNEY et al., 2009
Palha de arroz e farelo de trigo e casca de banana	<i>T. lanuginosus</i> VAPS24	KUMAR et al., 2017
Palha de milho	<i>T. lanuginosus</i> SSBP	SINGH et al., 2003
Palha de milho e bagaço de guayule (Parthenium argentatum)	<i>T. lanuginosus</i> STm	SIKANDAR et al., 2017
Palha de sorgo	<i>T. lanuginosus</i> D2W3	SONIA et al., 2005
Sabugo de milho	<i>T. lanuginosus</i> NIAB F220	BOKHARI et al., 2008
Sabugo de milho	<i>T. lanuginosus</i> THKU	KHUCHAROEN & SINMA, 2010
Sabugo de milho	<i>T. lanuginosus</i> IOC-4145	DAMASO et al., 2002
Sabugo de milho	<i>T. lanuginosus</i> SDYKY-1	SU et al., 2011
Sabugo de milho	<i>T. lanuginosus</i> MC134	KUMAR et al., 2009

Tabela 1: Resíduos agrícolas como fonte de carbono para produção de enzimas xilanolíticas por diferentes espécies de *Thermomyces*

Pode-se verificar na tabela 1 que dentre os resíduos agroindustriais mais estudados como fontes indutoras das xilanases por diferentes espécies de *T. lanuginosus* estão os derivados de milho como: sabugo e palha de milho, porém, os bagaços-de-cana e farelo de trigo também foram utilizados com frequência ao longo dos anos. Essa característica de induzir a produção de xilanase em cultivos desses fungos pode estar relacionada ao conteúdo de hemiceluloses encontradas nesses resíduos, conforme descrito por Gírio e colaboradores (2010) o sabugo de milho contém de 28 a 35,30 %, a palha de milho (25,5%), bagaço-de-cana (20,5 a 25,60 %) e farelo de trigo (19,2 a 21 %).

3 | ENZIMA XILANASE

As enzimas microbianas têm sido empregada como precursoras de uma tecnologia mais limpa para a produção de compostos com importância comercial e industrial, utilizando resíduos agrícolas ou industriais como substrato indutor (KUMAR; CHHABRA; SHUKLA, 2017; SHRIVASTAVA et al., 2016).

Muitas enzimas de origem fúngicas possuem capacidade de atuar em diferentes condições de pH e temperaturas, e ampla estabilidade, o que confere uma

característica de grande relevância para as indústrias (NIGAM, 2013). Alguns fungos como: *Aspergillus niger*, *Humicola insolens*, *Termomonospora fusca*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma longibrachiatum* e *Trichoderma koningii* têm sido utilizados como fontes notáveis de xilanases comerciais (GÍRIO et al., 2010; NIGAM, 2013).

A xilanase, é uma das enzimas produzidas pelo *T. lanuginosus* pertencente à família das glicosil hidrolases (GH) e a maioria das xilanases de origem fúngica pertencem à família GH10 e GH11 (DELLA TORRE & KADOWAKI, 2017; KUMAR; DANGI; SHUKLA, 2018), sendo que há relatos também de enzimas das famílias GH5, GH7, GH8 e GH43 (KUMAR; CHHABRA; SHUKLA, 2017).

As principais enzimas que compõem este sistema xilanolítico são as endoxilanases e as β -xilosidases. As endoxilanases (1,4- β -D-xilano-hidrolase, EC 3.2.1.8) atuam sobre o substrato xilano clivando randomicamente suas ligações β -1,4 em pequenos fragmentos de açúcares redutores denominados xilobiose, xilotriose, xilotetraose, xilopentose (KRONBAUER et al., 2007; KUMAR; CHHABRA; SHUKLA, 2017; NORDBERG KARLSSON et al., 2018).

Existem inúmeras enzimas comerciais derivadas de fungos com aplicações na indústria, um exemplo é a xilanase comercialmente vendida como Biolase Maxi® produzida pelo fungo *Aspergillus niger* (DELLA TORRE & KADOWAKI, 2017). As aplicações industriais destas enzimas produzidas por microrganismos têm sido no branqueamento de polpa na fabricação de papel (JUTURU; WU, 2012), como aditivos de ração animal (KUMAR; CHHABRA; SHUKLA, 2017), na clarificação de sucos de frutas e panificação (GHOSH; SUTRADHAR; BAISHYA, 2019).

4 | FUNGO *Thermomyces lanuginosus*

Os fungos denominados termófilos são cosmopolitas, sendo encontrados em vários ecossistemas, apresentam inúmeras características interessantes (SHI et al., 2019), uma delas é ter a capacidade de crescimento rápido em temperaturas elevadas, alcançando 45°C ou até mesmo mais altas, desempenhando assim um importante papel no ciclo do carbono (JI et al., 2015). Esses fungos são capazes de acelerar o processo de desconstrução da lignocelulose através da secreção das suas enzimas termoestáveis, além disso, as condições de fermentação desses microrganismos são ideais para muitas aplicações industriais (XIA; FANG; ZHANG, 2013), uma vez que reduz o risco de contaminação de cultivos (FROCK; KELLY, 2012; LI, 2015; OLSON et al., 2012; SHI et al., 2019).

Habitualmente, a microbiota fúngica que degrada substâncias lignocelulósicas aparecem em solo, colonizando os vegetais, desde suas raízes até seus resíduos, apresentando assim uma enorme função no processo de reciclagem de nutrientes (ROSA, 2014).

As características de adaptações às condições desfavoráveis de ambiente tais como, pH extremo, altas concentrações de sais e altas temperaturas estão

presentes nos fungos termófilos resultado da alteração na composição da membrana citoplasmática, do DNA e de proteínas destes fungos (DELLA TORRE & KADOWAKI, 2017; GOMES et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2014).

Dentre os vários exemplos de fungos termófilos de interesse biotecnológico, o *T. lanuginosus* vem se destacando por produzir enzimas extracelulares com propriedades excepcionais, como termoestabilidade elevada que permite uma extensa aplicação industrial (KUMAR et al., 2009; KUMAR; CHHABRA; SHUKLA, 2017; MANIMARAN et al., 2009; SHI et al., 2019). O fungo *T. lanuginosus*, também conhecido como *Humicola lanuginosa* compõe uma das quatro espécies do gênero *Thermomyces*: *T. verrucosus*; *T. ibadanensis* e *T. stellata* (DELLA TORRE & KADOWAKI, 2017).

O fungo foi isolado pela primeira vez por Tsiklinskaya (MANIMARAN et al., 2009) em um jardim, no ano de 1889, e recebeu como primeiro nome de *T. lanuginosus* Tsiklinsky (PUGH; BLAKEMAN; MORGAN-JONES, 1964). Este fungo apresenta crescimento completo em até 10 dias e em temperaturas acima de 45°C, podendo crescer até mesmo em 50°C (GAFFNEY et al., 2009).

Dependendo do local onde são isoladas, as colônias do *T. lanuginosus* podem modificar a tonalidade de sua coloração de claras a escuras. Inicialmente tem uma coloração esbranquiçada, acinzentada, alcançando até uma coloração marrom escura após plena maturação (KHUCHAROEN; SINMA, 2010). Os conídios formados por reprodução assexuada se apresentam incolores quando imaturos e paredes lisas, e quando amadurecem modificam-se para a coloração marrom escura e formato globoso com espessuras variando de 2 a 5 µm (KHUCHAROEN; SINMA, 2010).

Várias linhagens de *T. lanuginosus* têm sido relatadas como sendo importantes produtoras de diferentes enzimas com múltiplas aplicações biotecnológicas (KARTHIK; SHUKLA, 2012; KUMAR; CHHABRA; SHUKLA, 2017; SHRIVASTAVA et al., 2013). Os fungos da espécie *T. lanuginosus* apresentam a propriedade de secretar 40 enzimas glicosil hidrolases e 25 proteases quando crescido em diferentes fontes de carbono. Entre as 13 glicosil hidrolases identificadas com elevada expressão, 9 foram denominadas de glicosidases de açúcar redutores (RSGs) pertencentes a sete famílias de GH (Shi et al., 2019).

4.1 NOVA LINHAGEM DE *T. lanuginosus* ISOLADA DO BIOMA DA MATA ATLÂNTICA DO PARANÁ

Uma nova linhagem de *T. lanuginosus* foi isolada da Mata Atlântica da do Oeste do Paraná-Brasil (CORRÊA et al., 2016) e suas características de crescimento e morfologia bem como a atividade da xilanásica em placa são mostradas na figura 1A, B, C, D e E.

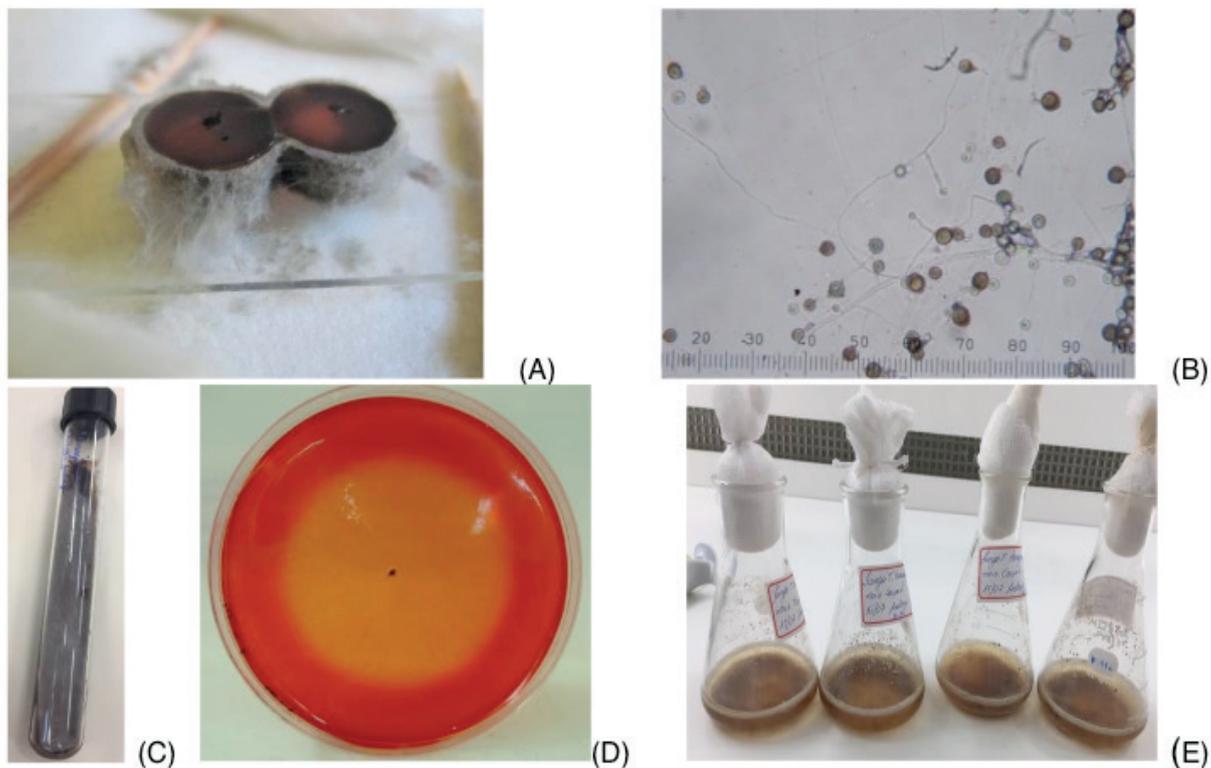


Figura 1: Microcultivo do fungo *Thermomyces lanuginosus* isolado do solo da Mata Atlântica do Oeste do Paraná-Brasil (A); Morfologia de conídios e hifas do fungo *T. lanuginosus* em microscopia (B); Cultivo em meio de ágar batata dextrose do fungo *T. lanuginosus* (C); Halo de hidrólise do xilano em placa revelado com solução vermelho de Congo, mostrando a atividade da xilanase do fungo *T. lanuginosus* (D); Cultivo líquido do fungo *T. lanuginosus* em meio Czapek suplementado com palha de milho como fonte de carbono (E).

Em estudo realizado com esse novo isolado de *T. lanuginosus* em cultivo submerso, utilizando quatro substratos lignocelulósicos como fontes de carbono (palha de milho, fibra de trigo, fibra de aveia e palha de arroz) obteve maior produção de xilanase (44,56 U/mL) com a palha de milho (Tabela 2), considerada uma matéria-prima barata e de fácil acesso, visto que o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, tendo alcançado 100 milhões de toneladas na safra de 2018/2019, um recorde para setor, apontando para um aumento na produção de 35,6% comparada com a safra do ano anterior 2017/2018. Além disso, o Conab (Companhia Nacional de Abastecimento) estima um recorde na exportação desse grão, com perspectiva de 35 milhões de toneladas (MAPA), 2019).

Fonte de carbono	Xilanase (U/mL)
Fibra de aveia	3,34 ± 0,30
Fibra de trigo	21,07 ± 0,55
Palha de arroz	1,15 ± 0,23
Palha de milho	44,56 ± 1,06

Tabela 2. Produção de xilanase por *T. lanuginosus* isolado da Mata Atlântica em cultivo submerso utilizando resíduos agrícolas como fonte de carbono

O fungo *T. lanuginosus* foi cultivado em meio líquido Czapek suplementado com

1% (p/v) de resíduos agrícolas (fibra de aveia, fibra de trigo, palha de arroz e palha de milho), incubado em estufa sob agitação (150 rpm) a 42°C, por 5 dias. A atividade da xilanase extracelular foi determinada incubando-se o extrato enzimático com o xilano de Beechwood 1% (p/v) em tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 6,5, a 65°C, e os açúcares redutores produzidos foram quantificados conforme o método de Miller (MILLER, 1959).

Pode-se conferir na tabela 2 que o fungo *T. lanuginosus* isolado proveniente do solo da Mata Atlântica do Oeste do Paraná, apresentou potencial como ótimo produtor de xilanase, quando crescido com a palha de milho como fonte de carbono, um resíduo agrícola de baixo custo e fácil obtenção. Cabe destacar que no Brasil apenas 5% da produção de cultivo de milho são destinados ao consumo humano. Os resíduos do processamento desta cultura representam 58% da biomassa produzida, e essa parcela ainda é negligenciada e poderia ser uma alternativa para contribuir como fontes renováveis de energia para gerar riqueza e minimizar acúmulo desses resíduos na natureza (CORRÊA et al., 2016; JUTURU; WU, 2012; SU et al., 2011).

5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos com resíduos ou subprodutos agroindustriais vêm contribuindo cada vez mais no sentido de aproveitar essa matéria-prima que é gerada pelo setor agrícola no processamento dos grãos. Assim, a utilização desses compostos como fontes alternativas de carbono em bioprocessos com fungos, como *T. lanuginosus*, para a produção de xilanases termoestáveis de interesse industrial, corrobora com a meta de agregar um valor comercial aos compostos que são subutilizados e descartados, além de proporcionar um meio ambiente mais limpo e sustentável. Ainda, contribui para o enriquecimento cada vez mais do ramo da pesquisa bem como na melhoria de técnicas e processos industriais.

REFERÊNCIAS

BASU, M.; KUMAR, V.; SHUKLA, P. **RECOMBINANT APPROACHES FOR MICROBIAL XYLANASES: RECENT ADVANCES AND PERSPECTIVES**. CURRENT PROTEIN & PEPTIDE SCIENCE, V. 19, N. 1, P. 87–99, 2018.

BOKHARI, S.; LATIF, F.; RAJOKA, M. I. **PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF XYLANASES FROM THERMOMYCES LANUGINOSUS AND ITS MUTANT DERIVATIVE POSSESSING NOVEL KINETIC AND THERMODYNAMIC PROPERTIES**. WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, V. 25, P. 493–502, 1 MAR. 2008.

BRIENZO, M. **EXTRAÇÃO DA HEMICELULOSE DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS**. TESE DE DOUTORADO—[S.L.] UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 26 MAR. 2010.

CORRÊA, J. M. et al. **HIGH LEVELS OF B-XYLOSIDASE IN THERMOMYCES LANUGINOSUS: POTENTIAL USE FOR SACCHARIFICATION**. BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, V. 47, N. 3, P. 680–690, JUL. 2016.

DAMASO, M. C. T.; ANDRADE, C. M. M. C.; PEREIRA JR, N. **PRODUCTION AND PROPERTIES OF THE CELLULASE-FREE XYLANASE FROM THERMOMYCES LANUGINOSUS IOC-4145.** BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, V. 33, N. 4, P. 333–338, DEZ. 2002.

DELLA TORRE, C. L.; KADOWAKI, M. K. **THERMOSTABLE XYLANASE FROM THERMOPHILIC FUNGI: BIOCHEMICAL PROPERTIES AND INDUSTRIAL APPLICATIONS.** AFRICAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY RESEARCH, V. 11, N. 2, P. 28–37, 14 JAN. 2017.

FARIAS, D. DE P. et al. **PREBIOTICS: TRENDS IN FOOD, HEALTH AND TECHNOLOGICAL APPLICATIONS.** TRENDS IN FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY, V. 93, P. 23–35, NOV. 2019.

FROCK, A. D.; KELLY, R. M. **EXTREME THERMOPHILES: MOVING BEYOND SINGLE-ENZYME BIOCATALYSIS.** CURRENT OPINION IN CHEMICAL ENGINEERING, V. 1, N. 4, P. 363–372, NOV. 2012.

GAFFNEY, M. et al. **PURIFICATION AND CHARACTERISATION OF A XYLANASE FROM THERMOMYCES LANUGINOSUS AND ITS FUNCTIONAL EXPRESSION BY PICHIA PASTORIS.** ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, V. 45, N. 5, P. 348–354, NOV. 2009.

GHOSH, A.; SUTRADHAR, S.; BAISHYA, D. **DELINEATING THERMOPHILIC XYLANASE FROM BACILLUS LICHENIFORMIS DM5 TOWARDS ITS POTENTIAL APPLICATION IN XYLOOLIGOSACCHARIDES PRODUCTION.** WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, V. 35, N. 2, P. 34, FEV. 2019.

GÍRIO, F. M. et al. **HEMICELLULOSES FOR FUEL ETHANOL: A REVIEW.** BIORESOURCE TECHNOLOGY, V. 101, N. 13, P. 4775–4800, JUL. 2010.

GOMES, E. et al. **ENZIMAS TERMOESTÁVEIS: FONTES, PRODUÇÃO E APLICAÇÃO INDUSTRIAL.** QUÍMICA NOVA, V. 30, N. 1, P. 136–145, FEV. 2007.

JI, S.-Q. et al. **DIVERSITY OF THERMOPHILIC MICROORGANISMS AND THEIR ROLES IN CARBON CYCLE. IN: THERMOPHILIC MICROORGANISMS.** EBOOK. CAISTER ACADEMIC PRESS, 2015. P. 13–46.

JIANG, Z. et al. **CHARACTERISATION OF A THERMOSTABLE XYLANASE FROM CHAETOMIUM SP. AND ITS APPLICATION IN CHINESE STEAMED BREAD.** FOOD CHEMISTRY, V. 120, N. 2, P. 457–462, 15 MAIO 2010.

JUTURU, V.; WU, J. C. **MICROBIAL XYLANASES: ENGINEERING, PRODUCTION AND INDUSTRIAL APPLICATIONS.** BIOTECHNOLOGY ADVANCES, V. 30, N. 6, P. 1219–1227, NOV. 2012.

KARTHIK, M. V. K.; SHUKLA, P. **COMPUTATIONAL STRATEGIES TOWARDS IMPROVED PROTEIN FUNCTION PROPHECY OF XYLANASES FROM THERMOMYCES LANUGINOSUS.** BOOK. SPRINGER SCIENCE & BUSINESS MEDIA, 2012.

KHUCHAROEN, K.; SINMA, K. **B-XYLANASE FROM THERMOMYCES LANUGINOSUS AND ITS BIOBLEACHING APPLICATION.** PAKISTAN JOURNAL OF BIOLOGICAL SCIENCES, V. 13, N. 11, P. 513–526, 1 NOV. 2010.

KOLENOVÁ, K.; VRŠANSKÁ, M.; BIELY, P. **MODE OF ACTION OF ENDO-B-1,4-XYLANASES OF FAMILIES 10 AND 11 ON ACIDIC XYLOOLIGOSACCHARIDES.** JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, V. 121, N. 3, P. 338–345, FEV. 2006.

KRONBAUER, E. A. W. et al. **PRODUÇÃO DE XILANASE POR ASPERGILLUS CASIELUS COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO.** BOLETIM DO CENTRO DE PESQUISA DE

KUMAR, K. S. et al. **PRODUCTION OF B-XYLANASE BY A THERMOMYCES LANUGINOSUS MC 134 MUTANT ON CORN COBS AND ITS APPLICATION IN BIOBLEACHING OF BAGASSE PULP.** JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, V. 107, N. 5, P. 494–498, MAIO 2009.

KUMAR, V.; CHHABRA, D.; SHUKLA, P. **XYLANASE PRODUCTION FROM THERMOMYCES LANUGINOSUS VAPS-24 USING LOW COST AGRO-INDUSTRIAL RESIDUES VIA HYBRID OPTIMIZATION TOOLS AND ITS POTENTIAL USE FOR SACCHARIFICATION.** BIORESOURCE TECHNOLOGY, V. 243, P. 1009–1019, NOV. 2017.

KUMAR, V.; DANGI, A. K.; SHUKLA, P. **ENGINEERING THERMOSTABLE MICROBIAL XYLANASES TOWARD ITS INDUSTRIAL APPLICATIONS.** MOLECULAR BIOTECHNOLOGY, V. 60, N. 3, P. 226–235, MAR. 2018.

LI, F. (ED.). **THERMOPHILIC MICROORGANISMS.** NORFOLK, UK: CAISTER ACADEMIC PRESS, 2015.

MANIMARAN, A. et al. **HYPER PRODUCTION OF CELLULASE-FREE XYLANASE BY THERMOMYCES LANUGINOSUS SSBP ON BAGASSE PULP AND ITS APPLICATION IN BIOBLEACHING.** APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, V. 81, N. 5, P. 887–893, JAN. 2009.

MELO, P. S. et al. **COMPOSIÇÃO FENÓLICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.** CIÊNCIA RURAL, SANTA MARIA, V. 41, N. 6, JUN. 2011.

MILLER, G. L. **USE OF DINITROSAIICYIIC ACID REAGENT FOR DETERMINATION OF REDUCING SUGAR.** ANALYTICAL CHEMISTRY, V. 31, N. 3, P. 426–428, 1959.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **BRASIL FECHA SAFRA 2018/2019 COM RECORDE DE 242,1 MILHÕES DE TONELADAS DE GRÃOS.** DISPONÍVEL EM: <[HTTP://WWW.AGRICULTURA.GOV.BR/NOTICIAS/BRASIL-FECHA-SAFRA-2018-2019-COM-RECORDE-DE-242-1-MILHOES-DE-TONELADAS-DE-GRAOS](http://www.agricultura.gov.br/noticias/brasil-fecha-safra-2018-2019-com-recorde-de-242-1-milhoes-de-toneladas-de-graos)>. ACESSO EM: 10 NOV. 2019.

NIGAM, P. **MICROBIAL ENZYMES WITH SPECIAL CHARACTERISTICS FOR BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS.** BIOMOLECULES, V. 3, N. 4, P. 597–611, 23 AGO. 2013.

NORDBERG, K. E, et al. **ENDO-XYLANASES AS TOOLS FOR PRODUCTION OF SUBSTITUTED XYLOOLIGOSACCHARIDES WITH PREBIOTIC PROPERTIES.** Applied Microbiology and Biotechnology, V. 102, N. 21, P. 9081-9088, NOV. 2018.

OKAFOR, U. A. et al. **Xylanase production by Aspergillus niger ANL 301 using agro - wastes.** African Journal of Biotechnology, v. 6, n. 14, 1 jan. 2007.

OLIVEIRA, D. S. et al. **Effect of a Thermoascus aurantiacus thermostable enzyme cocktail on wheat bread quality.** Food Chemistry, v. 143, p. 139–146, jan. 2014.

OLSON, D. G. et al. **Recent progress in consolidated bioprocessing.** Current Opinion in Biotechnology, v. 23, n. 3, p. 396–405, jun. 2012.

PUGH, G. J. F.; BLAKEMAN, J. P.; MORGAN-JONES, G. **Thermomyces verrucosus sp.nov. and T. lanuginosus.** Transactions of the British Mycological Society, v. 47, n. 1, p. 115-IN5, mar. 1964.

ROSA, I. Z. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos termofílicos produtores de celulasas, xilanases e celobiose desidrogenase com potencial para sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar.** Tese de mestrado da Universidade Estadual Paulista Julio Mesquita Filho, São José do Rio Preto, SP p. 78, 2014.

SHARMA, M.; KUMAR, A. **Xylanases - an overview**. British Biotechnology Journal, 1. v. 3, p. 1–28, 2013.

SHI, Z. et al. **Integrated Functional-Omics Analysis of Thermomyces lanuginosus Reveals its Potential for Simultaneous Production of Xylanase and Substituted Xylooligosaccharides**. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 187, n. 4, p. 1515–1538, abr. 2019.

SHRIVASTAVA, S. et al. **Characterization, cloning and functional expression of novel xylanase from Thermomyces lanuginosus SS-8 isolated from self-heating plant wreckage material**. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 29, n. 12, p. 2407–2415, dez. 2013.

SHRIVASTAVA, S. et al. **Enhanced xylanase production from Thermomyces lanuginosus NCIM 1374/ DSM 28966 using statistical analysis**. Journal of Pure and Applied Microbiology, v. 10, 2016. Disponível em: <<https://link.galegroup.com/apps/doc/A481650353/AONE?sid=ims>>. Acesso em: 1 nov. 2019.

SIKANDAR, S. et al. **Thermomyces lanuginosus STm: A source of thermostable hydrolytic enzymes for novel application in extraction of high-quality natural rubber from Taraxacum kok-saghyz (Rubber dandelion)**. Industrial Crops and Products, v. 103, p. 161–168, set. 2017.

SINGH, S.; MADLALA, A. M.; PRIOR, B. A. **Thermomyces lanuginosus : properties of strains and their hemicellulases**. FEMS Microbiology Reviews, v. 27, n. 1, p. 3–16, abr. 2003.

SONIA, K.; CHADHA, B.; SAINI, H. **Sorghum straw for xylanase hyper-production by (DW) under solid-state fermentation**. Bioresource Technology, v. 96, n. 14, p. 1561–1569, set. 2005.

SOUZA, L. O. et al. **Comparison of the biochemical properties between the xylanases of Thermomyces lanuginosus (Sigma®) and excreted by Penicillium roqueforti ATCC 10110 during the solid state fermentation of sugarcane bagasse**. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 16, p. 277–284, out. 2018.

SU, Y. et al. **Improvement of xylanase production by thermophilic fungus Thermomyces lanuginosus SDYKY-1 using response surface methodology**. New Biotechnology, v. 28, n. 1, p. 40–46, jan. 2011.

XIA, Y.; FANG, H. H. P.; ZHANG, T. **Recent studies on thermophilic anaerobic bioconversion of lignocellulosic biomass**. RSC Advances, v. 3, n. 36, p. 15528, 2013.

ZHANG, L. et al. **Thermomyces lanuginosus is the dominant fungus in maize straw composts**. Bioresource Technology, v. 197, p. 266–275, dez. 2015.

SOBRE O ORGANIZADOR:

Benedito Rodrigues da Silva Neto: Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado de Mato Grosso (2005), com especialização na modalidade médica em Análises Clínicas e Microbiologia (Universidade Candido Mendes - RJ). Em 2006 se especializou em Educação no Instituto Araguaia de Pós graduação Pesquisa e Extensão. Obteve seu Mestrado em Biologia Celular e Molecular pelo Instituto de Ciências Biológicas (2009) e o Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (2013) da Universidade Federal de Goiás. Pós-Doutorado em Genética Molecular com concentração em Proteômica e Bioinformática (2014). O segundo Pós doutoramento foi realizado pelo Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde da Universidade Estadual de Goiás (2015), trabalhando com o projeto Análise Global da Genômica Funcional do Fungo *Trichoderma Harzianum* e período de aperfeiçoamento no Institute of Transfusion Medicine at the Hospital Universitätsklinikum Essen, Germany. Seu terceiro Pós-Doutorado foi concluído em 2018 na linha de bioinformática aplicada à descoberta de novos agentes antifúngicos para fungos patogênicos de interesse médico.

Palestrante internacional com experiência nas áreas de Genética e Biologia Molecular aplicada à Microbiologia, atuando principalmente com os seguintes temas: Micologia Médica, Biotecnologia, Bioinformática Estrutural e Funcional, Proteômica, Bioquímica, interação Patógeno-Hospedeiro.

Sócio fundador da Sociedade Brasileira de Ciências aplicadas à Saúde (SBCSaúde) onde exerce o cargo de Diretor Executivo, e idealizador do projeto “Congresso Nacional Multidisciplinar da Saúde” (CoNMSaúde) realizado anualmente, desde 2016, no centro-oeste do país.

Atua como Pesquisador consultor da Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Goiás - FAPEG. Atuou como Professor Doutor de Tutoria e Habilidades Profissionais da Faculdade de Medicina Alfredo Nasser (FAMED-UNIFAN); Microbiologia, Biotecnologia, Fisiologia Humana, Biologia Celular, Biologia Molecular, Micologia e Bacteriologia nos cursos de Biomedicina, Fisioterapia e Enfermagem na Sociedade Goiana de Educação e Cultura (Faculdade Padrão). Professor substituto de Microbiologia/Micologia junto ao Departamento de Microbiologia, Parasitologia, Imunologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás. Coordenador do curso de Especialização em Medicina Genômica e Coordenador do curso de Biotecnologia e Inovações em Saúde no Instituto Nacional de Cursos. Atualmente o autor tem se dedicado à medicina tropical desenvolvendo estudos na área da micologia médica com publicações relevantes em periódicos nacionais e internacionais. Contato: dr.neto@ufg.br ou neto@doctor.com

ÍNDICE REMISSIVO

A

Agentes antibacterianos 21
Agro resíduo 166
Amilases 30, 31, 34, 35, 121, 123, 124, 130, 131, 132
Antimicrobiano natural 10
Apis melífera 20
Apiterapia 21
Atividade antibacteriana 1, 3, 4, 5, 6, 7, 16, 99
Atualidades 77

B

Baker's yeast strains 143, 146, 147, 148, 149, 150, 151
Bibliometric 155, 156
Botulismo 48, 49, 50, 51, 52, 55, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 63, 64

C

Cana de açúcar 169
Candida albicans 3, 7, 10, 11, 14, 17, 18, 19, 21, 22, 25, 86, 89, 91, 95
Cerveja 39, 40, 41, 42, 43, 44, 46, 47
Chá verde 39, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47
Clostridium botulinum 48, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 57, 60, 61, 62
Complexo xilanolítico 166

D

Diarrhea 93, 108, 109, 110, 111, 112, 114, 115, 116, 117, 118, 119

E

Escherichia coli 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 100, 102, 106, 108, 109, 111, 113, 114, 116, 117, 118, 119, 136, 137
Escolas 133, 134, 136, 138, 139, 140, 141
Essential Oils 7, 143, 144, 145, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153
Estresse oxidativo 86, 87, 88, 91, 92, 99, 103, 104
Exposição Ambiental 134

F

Fermentação alcoólica 46
Fermentação láctica 99, 100
Fungi 66, 131, 154, 155, 156, 160, 163, 164, 166, 167, 174
Fungo termófilo 166, 168

H

Halos de Degradação 30, 33, 35

Hemicelulose 166, 167, 173

I

Imunodeficiência 77, 79, 80, 82

Índice Enzimático 30, 33, 35

Industrial applications 143, 174, 175

L

Lectina 9, 10, 13, 15, 16

M

Microbiota Intestinal 11, 18, 85, 86, 87, 88, 101, 102

Modulação do sistema Imune 86

Multiplex PCR 108, 109, 111, 112, 113, 116, 119

O

Óbitos 48, 50, 57, 58, 59, 61, 62, 63

P

Paracoccidioides brasiliensis 154, 155, 156, 163, 164

Paraguai 133, 134, 135, 136, 138, 139, 140

Pathogenic Escherichia coli 18, 109

Patógenos Biológicos 134

Probióticos 85, 86, 87, 88, 89, 92, 93, 96, 98, 99, 101, 103

Punica granatum 1, 2, 3, 7, 8, 16, 17, 19

Q

Qualidade da água 134, 135, 137, 141

S

Saccharomyces cerevisiae 143, 144, 145, 146, 147, 151, 152, 153

Scientometric 155

Staphylococcus aureus 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 86, 94, 102

Staphylococcus epidermidis 6, 20, 21, 22, 24, 27

Syzygium aromaticum 1, 2, 3, 7, 8

T

Thermomyces lanuginosus 166, 167, 168, 170, 172, 173, 174, 175, 176

Tratamento Antirretroviral 77, 79, 84

V

Vírus 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 90

X

Xilose 32, 166

 **Atena**
Editora

2 0 2 0