

# Tópicos Multidisciplinares em Ciências Biológicas 3

Edson da Silva  
(Organizador)



 **Atena**  
Editora  
Ano 2020

# Tópicos Multidisciplinares em Ciências Biológicas 3

Edson da Silva  
(Organizador)



**Atena**  
Editora

Ano 2020

**Editora Chefe**

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

**Assistentes Editoriais**

Natalia Oliveira

Bruno Oliveira

Flávia Barão

**Bibliotecário**

Maurício Amormino Júnior

**Projeto Gráfico e Diagramação**

Natália Sandrini de Azevedo

Camila Alves de Cremonesi

Karine de Lima

Luiza Batista 2020 by Atena Editora

Maria Alice Pinheiro Copyright © Atena Editora

**Edição de Arte** Copyright do Texto © 2020 Os autores

Luiza Batista Copyright da Edição © 2020 Atena Editora

**Revisão** Direitos para esta edição cedidos à Atena Editora

Os Autores pelos 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, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. 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.

A Atena Editora não se responsabiliza por eventuais mudanças ocorridas nos endereços convencionais ou eletrônicos citados nesta obra.

**Conselho Editorial**

**Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**

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. Américo Junior Nunes da Silva – Universidade do Estado da Bahia

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

Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa

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

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

Prof. Dr. Elson Ferreira Costa – Universidade do Estado do Pará

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

Prof. Dr. Gustavo Henrique Cepolini Ferreira – Universidade Estadual de Montes Claros  
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Instituto Internazionale delle Figlie de Maria Ausiliatrice  
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense  
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins  
Prof. Dr. Luis Ricardo Fernandes da Costa – Universidade Estadual de Montes Claros  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Pontifícia Universidade Católica de Campinas  
Profª Drª Maria Luzia da Silva Santana – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
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  
Prof. Dr. Cleberton Correia Santos – Universidade Federal da Grande Dourados  
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. Jael Soares Batista – Universidade Federal Rural do Semi-Árido  
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. Douglas Siqueira de Almeida Chaves -Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
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  
Profª Drª Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira  
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Profª Drª Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras  
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria  
Prof. Dr. Helio Franklin Rodrigues de Almeida – Universidade Federal de Rondônia  
Profª Drª Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco  
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. Jesus Rodrigues Lemos – Universidade Federal do Piauí  
Prof. Dr. Jônatas de França Barros – Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Prof. Dr. Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas  
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá  
Profª Drª Regiane Luz Carvalho – Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino  
Profª Drª Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora  
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. Douglas Gonçalves da Silva – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia  
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará  
Profª Dra. Jéssica Verger Nardeli – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho  
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande  
Profª Drª Luciana do Nascimento Mendes – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte  
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

#### **Linguística, Letras e Artes**

Profª Drª Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins  
Profª Drª Angeli Rose do Nascimento – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro  
Profª Drª Denise Rocha – Universidade Federal do Ceará  
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 Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso  
Profª Drª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará  
Profª Drª Sandra Regina Gardacho Pietrobon – Universidade Estadual do Centro-Oeste  
Profª Drª Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia

## Conselho Técnico Científico

- Prof. Me. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo  
Prof. Me. Adalberto Zorzo – Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza  
Prof. Me. Adalto Moreira Braz – Universidade Federal de Goiás  
Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba  
Prof. Dr. Adilson Tadeu Basquerote Silva – Universidade para o Desenvolvimento do Alto Vale do Itajaí  
Prof. Me. Alexsandro Teixeira Ribeiro – Centro Universitário Internacional  
Prof. Me. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão  
Prof<sup>a</sup> Ma. Anne Karynne da Silva Barbosa – Universidade Federal do Maranhão  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Andrezza Miguel da Silva – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia  
Prof. Dr. Antonio Hot Pereira de Faria – Polícia Militar de Minas Gerais  
Prof. Me. Armando Dias Duarte – Universidade Federal de Pernambuco  
Prof<sup>a</sup> Ma. Bianca Camargo Martins – UniCesumar  
Prof<sup>a</sup> Ma. Carolina Shimomura Nanya – Universidade Federal de São Carlos  
Prof. Me. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Ma. Cláudia de Araújo Marques – Faculdade de Música do Espírito Santo  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cláudia Taís Siqueira Cagliari – Centro Universitário Dinâmica das Cataratas  
Prof. Me. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará  
Prof<sup>a</sup> Ma. Daniela da Silva Rodrigues – Universidade de Brasília  
Prof<sup>a</sup> Ma. Daniela Remião de Macedo – Universidade de Lisboa  
Prof<sup>a</sup> Ma. Dayane de Melo Barros – Universidade Federal de Pernambuco  
Prof. Me. Douglas Santos Mezacas – Universidade Estadual de Goiás  
Prof. Me. Edevaldo de Castro Monteiro – Embrapa Agrobiologia  
Prof. Me. Eduardo Gomes de Oliveira – Faculdades Unificadas Doctum de Cataguases  
Prof. Me. Eduardo Henrique Ferreira – Faculdade Pitágoras de Londrina  
Prof. Dr. Edwaldo Costa – Marinha do Brasil  
Prof. Me. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita  
Prof. Me. Euvaldo de Sousa Costa Junior – Prefeitura Municipal de São João do Piauí  
Prof<sup>a</sup> Ma. Fabiana Coelho Couto Rocha Corrêa – Centro Universitário Estácio Juiz de Fora  
Prof. Dr. Fabiano Lemos Pereira – Prefeitura Municipal de Macaé  
Prof. Me. Felipe da Costa Negrão – Universidade Federal do Amazonas  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Germana Ponce de Leon Ramírez – Centro Universitário Adventista de São Paulo  
Prof. Me. Gevair Campos – Instituto Mineiro de Agropecuária  
Prof. Dr. Guilherme Renato Gomes – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Me. Gustavo Krahl – Universidade do Oeste de Santa Catarina  
Prof. Me. Helton Rangel Coutinho Junior – Tribunal de Justiça do Estado do Rio de Janeiro  
Prof<sup>a</sup> Ma. Isabelle Cerqueira Sousa – Universidade de Fortaleza  
Prof<sup>a</sup> Ma. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia  
Prof. Me. Javier Antonio Albornoz – University of Miami and Miami Dade College  
Prof. Me. Jhonatan da Silva Lima – Universidade Federal do Pará  
Prof. Dr. José Carlos da Silva Mendes – Instituto de Psicologia Cognitiva, Desenvolvimento Humano e Social  
Prof. Me. Jose Elyton Batista dos Santos – Universidade Federal de Sergipe  
Prof. Me. José Luiz Leonardo de Araujo Pimenta – Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria Uruguay  
Prof. Me. José Messias Ribeiro Júnior – Instituto Federal de Educação Tecnológica de Pernambuco

Profª Drª Juliana Santana de Curcio – Universidade Federal de Goiás  
Profª Ma. Juliana Thaisa Rodrigues Pacheco – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Kamilly Souza do Vale – Núcleo de Pesquisas Fenomenológicas/UFPA  
Prof. Dr. Kárpio Márcio de Siqueira – Universidade do Estado da Bahia  
Profª Drª Karina de Araújo Dias – Prefeitura Municipal de Florianópolis  
Prof. Dr. Lázaro Castro Silva Nascimento – Laboratório de Fenomenologia & Subjetividade/UFPR  
Prof. Me. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Ma. Lilian Coelho de Freitas – Instituto Federal do Pará  
Profª Ma. Liliani Aparecida Sereno Fontes de Medeiros – Consórcio CEDERJ  
Profª Drª Lívia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás  
Prof. Me. Lucio Marques Vieira Souza – Secretaria de Estado da Educação, do Esporte e da Cultura de Sergipe  
Prof. Me. Luis Henrique Almeida Castro – Universidade Federal da Grande Dourados  
Prof. Dr. Luan Vinicius Bernardelli – Universidade Estadual do Paraná  
Prof. Dr. Michel da Costa – Universidade Metropolitana de Santos  
Prof. Dr. Marcelo Máximo Purificação – Fundação Integrada Municipal de Ensino Superior  
Prof. Me. Marcos Aurelio Alves e Silva – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo  
Profª Ma. Maria Elanny Damasceno Silva – Universidade Federal do Ceará  
Profª Ma. Marileila Marques Toledo – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri  
Prof. Me. Ricardo Sérgio da Silva – Universidade Federal de Pernambuco  
Prof. Me. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados  
Profª Ma. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal  
Prof. Me. Sebastião André Barbosa Junior – Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Profª Ma. Silene Ribeiro Miranda Barbosa – Consultoria Brasileira de Ensino, Pesquisa e Extensão  
Profª Ma. Solange Aparecida de Souza Monteiro – Instituto Federal de São Paulo  
Prof. Me. Tallys Newton Fernandes de Matos – Faculdade Regional Jaguaribana  
Profª Ma. Thatianny Jasmine Castro Martins de Carvalho – Universidade Federal do Piauí  
Prof. Me. Tiago Silvio Dedoné – Colégio ECEL Positivo  
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

# Tópicos multidisciplinares em ciências biológicas

3

**Editora Chefe:** Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira  
**Bibliotecário:** Maurício Amormino Júnior  
**Diagramação:** Camila Alves de Cremo  
**Edição de Arte:** Luiza Batista  
**Revisão:** Os Autores  
**Organizador:** Edson da Silva

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

T673 Tópicos multidisciplinares em ciências biológicas 3 [recurso eletrônico] / Organizador Edson da Silva. – Ponta Grossa, PR: Atena, 2020.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-65-5706-226-5

DOI 10.22533/at.ed.265202407

1. Ciências biológicas – Pesquisa – Brasil. I. Silva, Edson da.  
CDD 570

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

**Atena Editora**

Ponta Grossa – Paraná – Brasil

Telefone: +55 (42) 3323-5493

[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)

contato@atenaeditora.com.br

  
**Ano 2020**

## APRESENTAÇÃO

A coleção “Tópicos Multidisciplinares em Ciências Biológicas” é uma obra composta por estudos de diferentes áreas das ciências biológicas e da saúde. A obra foi ampliada e recebeu mais 47 capítulos distribuídos em três volumes. Os e-books foram organizados por trabalhos resultantes de pesquisas, ensaios teóricos e vivências dos autores.

As ciências biológicas englobam áreas do conhecimento relacionadas às ciências da vida e incluem a biologia, a saúde humana e a saúde animal. Nesta obra, apresento textos completos e atuais sobre estudos desenvolvidos durante a formação acadêmica ou na prática profissional. Os autores são filiados a diversos cursos de graduação e de pós-graduação em ciências biológicas, saúde, tecnologia e áreas afins.

Em seus 15 capítulos o volume 3 aborda, de forma categorizada, os trabalhos de pesquisas e revisões narrativas ou ensaios teóricos que transitam nos vários caminhos da atuação em ciências biológicas e áreas correlatas. Neste volume você encontra textos sobre biologia celular e molecular, microbiologia, meio ambiente e muito mais.

Espero que as experiências compartilhadas neste volume contribuam para o enriquecimento de novas práticas profissionais com olhares multidisciplinares para as ciências biológicas e suas áreas afins. Agradeço aos autores que tornaram essa edição possível e desejo uma ótima leitura a todos.

Edson da Silva

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
CLONAGEM MOLECULAR DA L-ASPARAGINASE DE <i>PROTEUS VULGARIS</i> EM VETOR DE EXPRESSÃO PARA FUSÃO À PROTEÍNA SUMO	
Iago Almeida da Ponte Cícero Matheus Lima Amaral Davi Almeida Freire Arnaldo Solheiro Bezerra Bruno Bezerra da Silva Maria Izabel Florindo Guedes	
<b>DOI 10.22533/at.ed.2652024071</b>	
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>6</b>
PROTEASES AND THEIR INHIBITORS IN COAGULATION AND INFLAMMATION	
Gabriella Silva Campos Carelli Joelton Igor Oliveira da Cruz Luciana Maria Araújo Rabêlo Bruno Oliveira de Veras Geovanna Maria de Medeiros Moura Jorge Anderson Nascimento dos Santos Antônio Moreira Marques Neto Anderson Felipe Jácome de França Yago Queiroz dos Santos	
<b>DOI 10.22533/at.ed.2652024072</b>	
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>17</b>
CRIOPRESERVAÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS DE EHRlich	
Beatriz Tessaroto Buscarino Silvia Regina Kleeb Carlos Pereira Araújo de Melo	
<b>DOI 10.22533/at.ed.2652024073</b>	
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>28</b>
ANÁLISE BIBLIOGRÁFICA DE microRNAs ENVOLVIDOS POR INFECÇÕES POR ARBOVIROSES DA FAMÍLIA FLAVIVIRIDAE	
Marcos Daniel Mendes Padilha Gustavo Moraes Holanda Ludmilla Ferreira Costa	
<b>DOI 10.22533/at.ed.2652024074</b>	
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	<b>31</b>
POTENTIAL PHARMACOLOGICAL APPLICATIONS OF LECTINS	
Geovanna Maria de Medeiros Moura Antônio Moreira Marques Neto Rayana Vanessa da Costa Lima Gabriella Silva Campos Carelli Joelton Igor Oliveira da Cruz Luciana Maria Araújo Rabêlo Anderson Felipe Jácome de França Bruno Oliveira de Veras Yago Queiroz dos Santos	
<b>DOI 10.22533/at.ed.2652024075</b>	

**CAPÍTULO 6 ..... 43**

PRODUÇÃO DE UM CONSÓRCIO ENZIMÁTICO VISANDO OBTENÇÃO DE ETANOL 2G A PARTIR DO BAGAÇO DE CANA

Ignácio Martins Pinho  
Ana Sílvia de Almeida Scarcella  
Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli

**DOI 10.22533/at.ed.2652024076**

**CAPÍTULO 7 ..... 67**

CARACTERIZAÇÃO DA GERAÇÃO DO SULFETO DE HIDROGÊNIO (H<sub>2</sub>S) EM TECIDOS DE CAMUNDONGOS COM SENESCÊNCIA ACELERADA (SAMP8)

Simone Aparecida Teixeira  
Gabriel Luciano Gomes  
Leandro Rodrigues  
Flávia Neto de Jesus  
Antonio Garcia Soares  
Anderson Romério Azevedo Cerqueira  
Karla Barroso Feitosa  
Karina Barbosa Alves  
Larissa Regina Silva de Oliveira  
Eliana Hiromi Akamine  
Marcelo Nicolás Muscará  
Soraia Kátia Pereira Costa

**DOI 10.22533/at.ed.2652024077**

**CAPÍTULO 8 ..... 79**

UTILIZAÇÃO DE POLPA DE ABACATE NA PRODUÇÃO DE BIOTENSOATIVO POR *Bacillus cereus*

Sumária Sousa e Silva  
Viviany Martins Bento  
Lainy Waleska de Brito Sodré  
José Wilson Pires Carvalho  
Sumaya Ferreira Guedes  
Raquel Aparecida Loss

**DOI 10.22533/at.ed.2652024078**

**CAPÍTULO 9 ..... 91**

REAÇÕES BIOCATALÍTICAS COMO POTENCIAL PARA OBTENÇÃO DE BIOPRODUTOS

Magno de Lima Silva  
Wellyson Journey dos Santos Silva  
Natasha Matos Monteiro  
Allana Kellen Lima Santos Pereira

**DOI 10.22533/at.ed.2652024079**

**CAPÍTULO 10 ..... 99**

EFEITO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS NO CRESCIMENTO RADICULAR DE *CHLOROLEUCON DUMOSUM* (BENTH) G. P. LEWIS

Maria Janiele Barbosa de Farias Pereira  
Roberta Samara Nunes de Lima  
Alaide Maria Silva Santos  
Joseliane Fernandes Miguel dos Santos  
Wander Gustavo Botero  
Flávia de Barros Prado Moura  
Jakson Leite

**DOI 10.22533/at.ed.26520240710**

**CAPÍTULO 11 ..... 106**

ASPECTOS ECOLÓGICOS DA POLINIZAÇÃO de *Ruellia asperula* (MART. EX NEES) LINDAU EM ÁREAS DE CAATINGA SUBMETIDAS A DIFERENTES MANEJOS

Breno Costa Figueiredo  
Mikael Alves de Castro  
Sabrina Silva Oliveira  
Gabrielle Kathelin Martins da Silva  
Ana Carolina Sabino de Oliveira  
Mychelle de Sousa Fernandes  
Jefferson Thiago Souza

**DOI 10.22533/at.ed.26520240711**

**CAPÍTULO 12 ..... 116**

PLANTAS TÓXICAS ENCONTRADAS NOS PASTOS DA FAZENDA ESCOLA DO CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA DO UNIFESO, TERESÓPOLIS/RJ

Lucas Cavalcante de Moura  
Luciana Cavalcante de Moura  
Fernanda Stefany Nunes Costa  
George Azevedo de Queiroz  
André Vianna Martins

**DOI 10.22533/at.ed.26520240712**

**CAPÍTULO 13 ..... 125**

DADOS ALIMENTARES E REPRODUTIVOS DE *Knodus moenkhausii*, (EIGENMANN E KENNEDY, 1903), DA SUB-BACIA DO RIO QUEIMA-PÉ EM TANGARÁ DA SERRA-MT

Divina Sueide de Godoi  
Joelson Viana Nogueira  
Luiz Antonio Jacyntho  
Cristiane Regina do Amaral Duarte  
Jhonathan Ferreira Santos Maceno

**DOI 10.22533/at.ed.26520240713**

**CAPÍTULO 14 ..... 137**

ETNOCONHECIMENTO SOBRE POLINIZAÇÃO EM UMA COMUNIDADE RURAL DA REGIÃO SEMIÁRIDA

Bruna Letícia Pereira Braga  
José Vinícius Oliveira Silva  
Gabrielle Kathelin Martins da Silva  
Fernanda Fernandes da Silva  
Marlos Dellan de Souza Almeida  
Célio Moura Neto  
Jefferson Thiago Souza

**DOI 10.22533/at.ed.26520240714**

**CAPÍTULO 15 ..... 149**

AValiação de trabalhos publicados em encontros universitários sobre o impacto ambiental no estado do Ceará, Brasil

Marcos Adelino Almeida Filho  
Josiany Costa de Souza  
Lucas Farias Pinheiro  
Manuella Maciel Gomes  
Isabelly Maria Barros de Lima  
Itatiaia de Souza Sampaio  
Lydia Dayanne Maia Pantoja

**DOI 10.22533/at.ed.26520240715**

**SOBRE O ORGANIZADOR..... 162**

**ÍNDICE REMISSIVO ..... 163**

## CLONAGEM MOLECULAR DA L-ASPARAGINASE DE PROTEUS VULGARIS EM VETOR DE EXPRESSÃO PARA FUSÃO À PROTEÍNA SUMO

Data de aceite: 01/07/2020

Data de submissão: 15/04/2020

**Maria Izabel Florindo Guedes**

Universidade Estadual do Ceará, Centro de  
Ciências da Saúde (CCS)

Fortaleza – Ceará

<http://lattes.cnpq.br/5282771143306034>

**Iago Almeida da Ponte**

Universidade Estadual do Ceará, Centro de  
Ciências da Saúde (CCS)

Fortaleza – Ceará

<http://lattes.cnpq.br/6099336828452568>

**Cícero Matheus Lima Amaral**

Universidade Estadual do Ceará, Centro de  
Ciências da Saúde (CCS)

Fortaleza – Ceará

<http://lattes.cnpq.br/7635835808312265>

**Davi Almeida Freire**

Universidade Estadual do Ceará, Laboratório de  
Biotecnologia e Biologia Molecular (LBBM)

Fortaleza – Ceará

<http://lattes.cnpq.br/3135019051050847>

**Arnaldo Solheiro Bezerra**

Universidade Estadual do Ceará, Centro de  
Ciências da Saúde (CCS)

Fortaleza – Ceará

<http://lattes.cnpq.br/6502267777837412>

**Bruno Bezerra da Silva**

Universidade Estadual do Ceará, Laboratório de  
Biotecnologia e Biologia Molecular (LBBM)

Fortaleza – Ceará

<http://lattes.cnpq.br/2484362127391945>

**RESUMO:** A leucemia linfóide aguda é o tipo de câncer mais comum entre crianças e adolescentes, e uma forma de tratamento que vêm sendo amplamente estudada é o uso das L-asparaginases, que atuam nas células tumorais catalisando a reação de hidrólise do aminoácido L-asparagina em ácido L-aspártico e amônia. O presente estudo teve como objetivo a produção de L-asparaginase da espécie de bactérias *Proteus vulgaris* associada à proteína SUMO, buscando evitar a formação de corpos de inclusão. Utilizando-se de procedimentos padrões de laboratório para a ligação dos genes e sua transformação em bactérias. Obtendo, com sucesso, o produto de ligação do inserto do gene codificante no plasmídeo de expressão.

**PALAVRAS-CHAVE:** Asparaginase. *Proteus vulgaris*. SUMO.

# MOLECULAR CLONING OF L-ASPARAGINASE FROM *PROTEUS VULGARIS* IN AN EXPRESSION VECTOR TO FUSE WITH SUMO PROTEIN

**ABSTRACT:** The acute lymphoid leukemia is the most common type of cancer between children and teenagers, and one type of treatment that has been largely researched is the use of L-asparaginase, this protein acts in the tumoral cells catalyzing the hydrolysis of the L-asparagine amino acid into L-aspartic acid and ammonia. The present study had as an objective the production of L-asparaginase, from the bacteria species *Proteus vulgaris*, associated with SUMO protein, looking to avoid the formation of inclusion bodies. Utilizing the standard laboratory procedures to ligate the genes and transform the bacteria. Obtaining, successfully, the ligation product from the codification gene insert in the expression plasmid.

**KEYWORDS:** Asparaginase. *Proteus vulgaris*. SUMO.

## 1 | INTRODUÇÃO

A leucemia representa um grupo de neoplasias malignas derivadas das células hematopoiéticas. Esta doença inicia sempre na medula-óssea e posteriormente invade o sangue periférico, podendo atingir vários órgãos do indivíduo acometido. A biologia molecular da leucemia indica que a ocorrência desta patologia acontece por meio da desregulação de genes que atuam na homeostase e no desenvolvimento celular, especificamente na translocação dos genes (GROSSMAN; PORTH, 2014).

Em 1953 pesquisadores descobriram que o soro de porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*) possuía atividades antitumorais. Subsequentemente descobriu-se que essa atividade resultava de altas concentrações de L-asparaginase presente no sangue do animal. Em 1963 foi descoberta uma enzima presente em *Escherichia coli* com capacidade antitumoral, resultando em diversos trabalhos que levaram a asparaginase II de *E. coli* a ser a primeira L-asparaginase utilizada clinicamente contra a leucemia (WHITECAR, et al., 1970).

As L-asparaginases são amplamente distribuídas na natureza e atualmente são utilizadas como fármaco para o tratamento de leucemia linfóide aguda. Elas atuam nas células tumorais catalisando a reação de hidrólise do aminoácido L-asparagina em ácido L-aspártico e amônia. A asparagina é essencial à síntese proteica, e sua depleção efetiva resulta em citotoxicidade para as células tumorais (VERMA et al., 2007).

A expressão de proteínas heterólogas, em *E. coli*, comumente leva a formação de corpos de inclusão, que podem ser definidos como o enovelamento irregular das proteínas formadas. Isso pode ocorrer por conta da alta capacidade de expressão de um inserto, produzindo altas quantidades de proteínas e lotando o citoplasma com estas macromoléculas, impedindo-as de se enovelar corretamente por falta de espaço (BUTT et al., 2005; TSUMOTO et al., 2003).

Este trabalho teve como objetivo a produção de L-asparaginase da espécie de bactérias *Proteus vulgaris* associada à proteína SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) para prevenir a formação de corpos de inclusão pós-traducional, por sua capacidade de enovelamento rápido e estável mesmo quando expressada em altas quantidades (PANAVALAS; SANDERS; BUTT, 2009).

## 2 | METODOLOGIA

Foram realizadas as purificações e transformações dos plasmídeos de clonagem (PUC, contendo o inserto de DNA, para L-asparaginase, da espécie *Proteus vulgaris*) e de expressão (pET28a – SUMO). A purificação foi realizada de acordo com o protocolo do sistema de purificação de DNA PureYield™ Plasmid Miniprep (Promega), posteriormente digeridos utilizando as enzimas de restrição EcoRI 4000 U (G AATT C) e BamHI 4000 U (G GATC C), para a clivagem dos plasmídeos (pET28a com o intuito de abrir e PUC com o intuito de separar a sequência codificante do restante do plasmídeo). Para a segunda purificação, separando a amostra digerida do em eletroforese em gel de agarose (separação por peso molecular), seguiu-se o protocolo do kit ReliaPrep™ DNA Clean-Up and Concentration System, posteriormente o inserto foi ligado ao plasmídeo de expressão utilizando a enzima T4 DNA Ligase e então os produtos ligados foram transformados em bactérias competentes (*E. Coli*).

Das colônias obtidas, duas foram selecionadas para confirmação utilizando a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, corados (SYBR Safe DNA Gel Stain, Invitrogen) para sua visualização em luz ultravioleta.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a expressão bem-sucedida da L-asparaginase em *E. coli* em etapa prévia ao desenvolvimento deste trabalho, descobrimos que os produtos proteicos estavam formando corpos de inclusão, tornando-as insolúveis e impossibilitando sua atividade. Portanto, pensou-se em uma fusão de proteínas, após pesquisas, descobrimos que a proteína SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) da levedura *Saccharomyces cerevisiae* poderia aumentar a estabilidade pós-traducional da L-asparaginase. Dessa forma, fora desenvolvido um plasmídeo de expressão com a sequência de genes para a produção de uma proteína de asparaginase fusionada com a proteína SUMO possuindo cauda de histidina para sua purificação cromatográfica.

Os plasmídeos purificados utilizando o kit DNA PureYield™ Plasmid Miniprep apresentaram concentração média de ácidos nucleicos de 120 ng/μL. Estes plasmídeos

foram digeridos e aplicados em gel para a separação do inserto de interesse do restante do plasmídeo. As bandas obtidas foram compatíveis com o peso molecular esperado (Figura 1).

Após a foto documentação, realizou-se o corte das bandas de interesse do gel e posteriormente a sua purificação utilizando o kit ReliaPrep™ DNA Clean-Up and Concentration System. Os produtos da purificação foram ligados e transformados em *E. coli* competentes, a transformação foi bem-sucedida, de forma que as colônias cresceram no controle positivo e não cresceram no controle negativo. As colônias recombinantes foram confirmadas pela amplificação por PCR dos insertos ligados, revelando bandas em tamanho equivalente ao esperado para a inserção do gene da L-asparaginase de *P. vulgaris* no plasmídeo pET28a-SUMO.

Diferentes formas de expressão de L-asparaginases vêm sendo empregadas na biologia molecular, como a utilização de proteínas de diferentes espécies, enzimas de restrição, protocolos de clonagem, etc.

Jia et al. (2013) realizou a expressão da L-asparaginase de uma nova bactéria *Bacillus subtilis* e se utilizou de um protocolo divergente ao utilizado neste estudo o protocolo de purificação, kit Minichromosome Rapid Isolation. Para a digestão dos plasmídeos foram utilizadas as mesmas enzimas de restrição do presente trabalho, mas não necessitou da utilização de uma proteína acessória (como a SUMO) para a purificação da proteína.

Upadhyay et al. (2014) realizou a clonagem de L-asparaginase II de *E. coli* sem a utilização de proteínas acessória, foi-se necessário em seu trabalho a solubilização para o remodelamento das proteínas expressas, obtendo-se êxito em tornar a enzima ativa novamente.

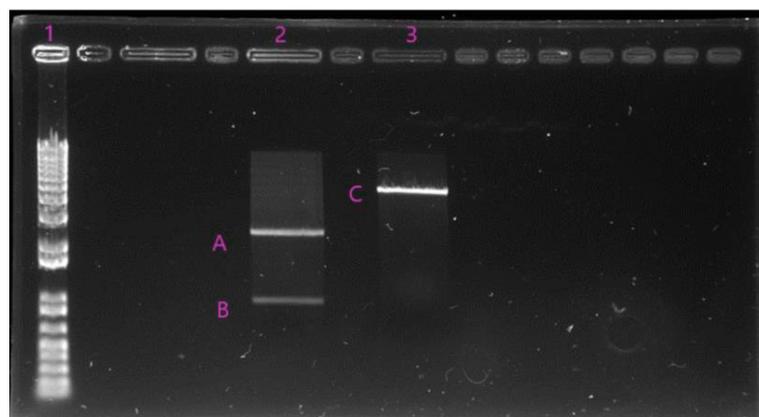


Figura 1 – Tratamento dos plasmídeos de clonagem e expressão com as enzimas de restrição EcoRI e BamHI

Poço 1 – Marcador de peso molecular 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen); Poço 2A – Plasmídeo pUC57 após liberação do inserto; Poço 2B – Sequencia codificante para a L-asparaginase de *Proteus vulgaris* liberada do plasmídeo pUC57; Poço 3C – Plasmídeo pET28a-SUMO após linearização com as enzimas de restrição. Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

## 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Portanto, ao concluir o presente trabalho foi possível a obtenção de bactérias transformadas pelos produtos de ligação do plasmídeo pET-28a e do inserto do gene de asparaginase contendo uma sequência codificante para a proteína SUMO, isso nos propulsiona a continuar desenvolvendo este trabalho com o fim de expressar proteínas L-asparaginase recombinantes de diferentes espécies para o uso em terapias oncológicas.

## REFERÊNCIAS

- BUTT, Tauseef R; EDAVETTAL, Suzzane C; HALL, John P; MATTERN, Michael R. **SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins**. Protein Expression And Purification, v. 43, n. 1, p.1-9, set. 2005.
- GROSSMAN, Sheila; PORTH, Carol Mattson. **Porth's Pathophysiology: Concepts of Altered Health States**. 9. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2014. 1690 p.
- JIA, Mingmei; XU, Meijuan; HE, Beibei; RAO, Zhiming. Cloning, **Expression, and Characterization of I-Asparaginase from a Newly Isolated Bacillus subtilis B11-06**. Journal Of Agricultural And Food Chemistry, v. 61, n. 39, p. 9428-9434, set. 2013.
- PANAVAS, Tadas; SANDERS, Carsten; BUTT, Tauseef R.. **SUMO Fusion Technology for Enhanced Protein Production in Prokaryotic and Eukaryotic Expression Systems**. Methods In Molecular Biology, p.303-317, 2009.
- TSUMOTO, Kouhei; EJIMA, Daisuke; KUMAGAI, Izumi; ARAKAWA, Tsutomu. **Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies**. Protein Expression And Purification, v. 28, n. 1, p.1-8, mar. 2003.
- UPADHYAY, Arun K; SINGH, Anupam; MUKHERJEE, K. J; PANDA, Amulya K. **Refolding and purification of recombinant L-asparaginase from inclusion bodies of E. coli into active tetrameric protein**. Frontiers In Microbiology, v. 5, p.1-11, 15 set. 2014.
- VERMA, Neelam; KUMAR, Kuldeep; KAUR, Gurnoor; ANAND, Sneha. **L-Asparaginase: A Promising Chemotherapeutic Agent**. Critical Reviews In Biotechnology, v. 27, n. 1, p.45-62, jan. 2007.
- WHITECAR, John P; BODEY, Gerald P; HARRIS, Jules E; FREIREICH, Emil J. **L-Asparaginase**. New England Journal Of Medicine, v. 282, n. 13, p. 732-734, 26 mar. 1970.

## PROTEASES AND THEIR INHIBITORS IN COAGULATION AND INFLAMMATION

*Data de aceite: 01/07/2020*

*Data de submissão: 01/04/2020*

### **Gabriella Silva Campos Carelli**

Federal University of Rio Grande do Norte,  
Department of Biochemistry Institute of Tropical  
Medicine

Natal, Rio Grande do Norte – Brazil

<http://lattes.cnpq.br/3384152759391301>

### **Joelton Igor Oliveira da Cruz**

Federal University of Rio Grande do Norte,  
Department of Biochemistry

Natal, Rio Grande do Norte – Brazil

<http://lattes.cnpq.br/2448189217304566>

### **Luciana Maria Araújo Rabêlo**

Federal Institute of Education, Science and  
Technology of Rio Grande do Norte

Lajes, Rio Grande do Norte – Brazil

<http://lattes.cnpq.br/2165223941043909>

### **Bruno Oliveira de Veras**

Federal University of Pernambuco, Department of  
Microbiology

Recife, Pernambuco - Brazil

<http://lattes.cnpq.br/7515860243444988>

### **Geovanna Maria de Medeiros Moura**

Instituição de Ensino, Faculdade ou Departamento  
Federal University of Rio Grande do Norte,  
Department of Biochemistry

Natal, Rio Grande do Norte - Brazil

<http://lattes.cnpq.br/0915146393491834>

### **Jorge Anderson Nascimento dos Santos**

Federal University of Rio Grande do Norte,  
Department of Biochemistry

Institute of Tropical Medicine

Natal, Rio Grande do Norte - Brazil

<http://lattes.cnpq.br/6746836941013628>

### **Antônio Moreira Marques Neto**

Federal University of Rio Grande do Norte,  
Department of Biochemistry

Natal, Rio Grande do Norte - Brazil

<http://lattes.cnpq.br/3751524824523494>

### **Anderson Felipe Jácome de França**

Multicampi School of Medical Sciences

Caicó, Rio Grande do Norte - Brazil

<http://lattes.cnpq.br/6032490085835412>

### **Yago Queiroz dos Santos**

Federal Institute of Education, Science and  
Technology of Ceará

Boa Viagem, Ceará – Brazil

Institute of Tropical Medicine

Natal, Rio Grande do Norte – Brazil

<http://lattes.cnpq.br/6854116205386919>

**ABSTRACT:** Proteases or peptidases are molecules that promote cleavage through the hydrolysis of peptide bonds present in proteins and polypeptides, transforming them into smaller amino acid or polypeptide residues. The group of serine proteases is predominant

in peptidases and is found in almost all living organisms, constituting the family of proteases best characterized and physiologically versatile. Within the serine proteases are protease inhibitors, proteins capable of blocking and / or inhibiting the catalytic activity of proteolytic enzymes, being found naturally in most living organisms. In serine protease inhibitors, two distinct categories have already been classified, entrapment inhibitors and high affinity inhibitors. The hemostatic system participates in maintaining balance in living organisms, maintaining adequate blood pressure and perfusion, controlling bleeding caused by damage to blood vessels, through processes known as coagulation, where most factors in the coagulation cascade are serine proteases or cofactors . Among the most important serine proteases that act in the coagulation cascade are some coagulation factors (II, VII, IX, X, XI, XII, for example), the vasodilating molecule kallikrein, which is also a serine protease that acts on various substrates releasing vasoactive peptides, exercising their natural functions. In disorders in this cascade, medicine uses inhibitors with anticoagulant action, managing to reverse or inhibit these diseases. In inflammatory reactions, which is an essential step for controlling microbial invasion or tissue damage, as well as for maintaining tissue homeostasis, neutrophils secrete serine proteases such as neutrophil elastase (NE1), proteinase 3 (PR3) and cathepsin G (CG), which are components of one of the most important molecular arsenals for the defense of the organism. Therefore, these facts suggest that new studies in this area are of great relevance to the evolution of science and medicine.

**KEYWORDS:** Proteases, protease inhibitors, coagulation.

## PROTEASES E SEUS INIBIDORES NOS PROCESSOS DE COAGULAÇÃO E INFLAMAÇÃO

**RESUMO:** Proteases ou peptidases são moléculas que promovem a clivagem através da hidrólise de ligações peptídicas presentes em proteínas e polipeptídeos, transformando-os em resíduos de aminoácidos ou polipeptídeos menores. O grupo das serina-proteases é predominante nas peptidases e é encontrado em quase todos os organismos vivos, constituindo a família de proteases melhor caracterizadas e fisiologicamente versáteis. Dentro das serino-proteases estão os inibidores de protease, proteínas capazes de bloquear e/ou inibir a atividade catalítica das enzimas proteolíticas, sendo encontradas naturalmente na maioria dos organismos vivos. Nos inibidores de proteases de serina, já foram classificadas duas categorias distintas, os inibidores de aprisionamento e inibidores de alta afinidade. O sistema hemostático participa da manutenção do equilíbrio nos organismos vivos, mantendo pressão e perfusão sanguínea adequadas, controlando o sangramento causado por danos aos vasos sanguíneos, através de processos conhecidos como coagulação, onde a maioria dos fatores na cascata de coagulação são serina proteases ou cofatores. Entre as serina proteases mais importantes que atuam na cascata de coagulação estão alguns fatores de coagulação (II, VII, IX, X, XI, XII, por exemplo), a molécula vasodilatadora calicreína, que também é uma serina protease que atua em vários substratos liberando vasoativo

peptídeos, exercendo suas funções naturais. Em distúrbios nessa cascata, a medicina utiliza de inibidores com ação anticoagulante, conseguindo reverter ou inibir essas doenças. Nas reações Inflamatórias, que é uma etapa essencial para o controle da invasão microbiana ou lesão tecidual, bem como para a manutenção da homeostase tecidual, os neutrófilos secretam serina proteases como elastase de neutrófilos (NE1), proteinase 3 (PR3) e catepsina G (CG), que são componentes de um dos arsenais moleculares mais importantes para a defesa do organismo. Sendo assim, esses fatos sugerem que novos estudos nessa área são de grande relevância para a evolução da ciência e medicina.

**PALAVRAS-CHAVE:** Proteases, inibidores de proteases, coagulação.

## 1 | INTRODUCTION

In general, proteases or peptidases are a group of molecules that promote cleavage through the hydrolysis of peptide bonds present in proteins and polypeptides, transforming them into amino acid residues or smaller polypeptides (ABBENANTE; FAIRLIE, 2006). They can be divided into two groups: exopeptidases, which have the ability to hydrolyze amino acids in the N or C terminal portions of the polypeptide chains, and endopeptidases, which cleave the internal peptide bonds of the chain; endopeptidases are still classified according to their catalytic mechanism and its specificity in four families: aspartic, serine, cysteine and metal proteases (ABBENANTE; FAIRLIE, 2006), as seen in Table 1.

CLASSES	REPRESENTANTS	ACTIVE SITE
Serine peptidases	Chymotrypsin Trypsin Elastase Cathepsins A and G	Ser, Asp, His
Cysteine peptidases	Papain Actinidine Caspases Cathepsins B, C, H, K, L, O, S and W	Cys
Aspartic peptidases	Pepsin Cathepsins D and E Renin	Asp, Try
Metallopeptidases	Carboxipeptidase A and B Aminopeptidases Thermolysin	Metal Ions

Table 1. Proteases classification (Adapted from SANTOS et al., 2012).

The group of serine proteases is the predominant catalytic type in peptidases and is found in almost all living organisms, constituting the family of proteases best characterized and physiologically versatile (LÓPEZ-OTÍN; BOND, 2008). The pancreatic serine proteases trypsin, chymotrypsin, elastase, cathepsin G, among others, have a chemical characteristic that unites them in this group, the presence in their active sites of the catalytic triad asparagine (Asp), histidine (His) and serine (Ser). The catalysis mechanism occurs through a transition stage between acylation and deacylation (DOS SANTOS et al., 2012).

In humans, generally, serine proteases are involved in several important physiological processes such as digestion, blood clotting, healing, cell differentiation and growth, cell signaling, immune response and apoptosis, that are just some of the most cited examples. Most proteases related to these pathways belong to the class of serine proteases (HUSSAIN et al., 2014; POWERS; ASGIAN; JAMES, 2002; ZHU et al., 2017) and as such, the action of these proteases, in vivo, is controlled by several mechanisms such as: regulation of gene expression; activation of its inactive zymogens; blockade by endogenous inhibitors; Targeting specific compartments such as lysosomes, mitochondria and specific apical membranes; post-translational modifications such as glycosylation, bonding to metals, bonding in disulfide bridges (S-S), proteolysis and degradation (LÓPEZ-OTÍN; BOND, 2008). Thus, among the main active agents in these control pathways are protease inhibitors, which are proteins capable of block and / or inhibit the catalytic activity of proteolytic enzymes, being found naturally in most living organisms (PAIVA et al., 2013).

Inhibitors are ubiquitous proteins - whose molecular mass ranges from 10 KDa to 90 KDa - occur in plants, animals and microorganisms; being extremely abundant in plants in the tissues of vegetative, reproductive and storage organs. In seeds and tubers, about 10% of the total proteins are composed of protease inhibitors (MANDAL et al., 2002; SANTOS et al., 2012).

Contact between the protease inhibitor and the protease itself is complementary, due to the interactions between the active site of the proteinase and the segment of the polypeptide chain of the inhibitor that contains the reactive site, which is why its enzyme-inhibitor complex is established quickly and its dissociation occurs slowly (LASKOWSKI; QASIM, 2000). This complex can produce changes in the conformation of its inhibitory molecule, such as, for example, the rotation of side chains in a way that keeps the main enzyme chain with little movement (LU et al., 1997).

### 1.1 Serine protease inhibitors

Some important groups of serine protease inhibitors have been identified, both in plants and in animals, and can be classified into two distinct categories: entrapment inhibitors, that include  $\alpha$ 2-macroglobulins and serpins; and high-affinity inhibitors, such as Kunitz and Kazal-type inhibitors (Figure 1). Inhibition by entrapment inhibitors can result in proteolytic cleavage, whereas proteases linked to strong binding inhibitors can

be released intact, whereas inhibitors can be released in their native or cleaved form (BLISNICK; FOULON; BONNET, 2017).

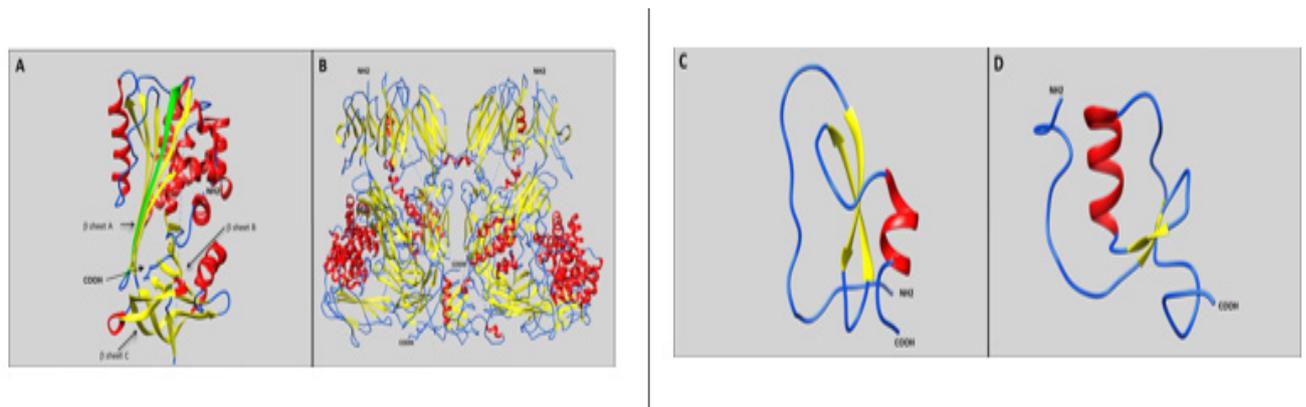


Figure 1 - **Representation of the secondary structure of protease inhibitors.**  $\alpha$ -helix, loops and  $\beta$ -leaves are represented in red, blue and yellow respectively. *A* - *Ixodis ricinus* serpin (PDB number: 3NDA); *B* -  $\alpha$ 2 human macroglobulin component 5 (C5) of the complement system (PDB number: 3CU7); *C* - *R. appendiculatus* Kunitz Inhibitor (PDB number: 2UUx).; *D* - Kazal inhibitor of *Dipetalogaster maximus* (PDB number: 1KMA). Image adapted from Blisnick, 2017.

The interaction of the inhibitor with the target serine protease can occur through the binding to the reactive site, which can present different conformations and a high degree of flexibility, thus, each serine protease inhibitor family has its characteristic inhibition mechanism. (TREMACOLDI, 2009).

## 1.2 Protease inhibitors and coagulation

Living organisms are in a stable equilibrium, where adjustments are made in response to any stimulus, negative or positive, that may disturb this balance. The hemostatic system participates in maintaining this balance by maintaining adequate blood pressure and perfusion, controlling bleeding caused by damage to blood vessels, through processes known as coagulation (GIORDANO et al., 2017).

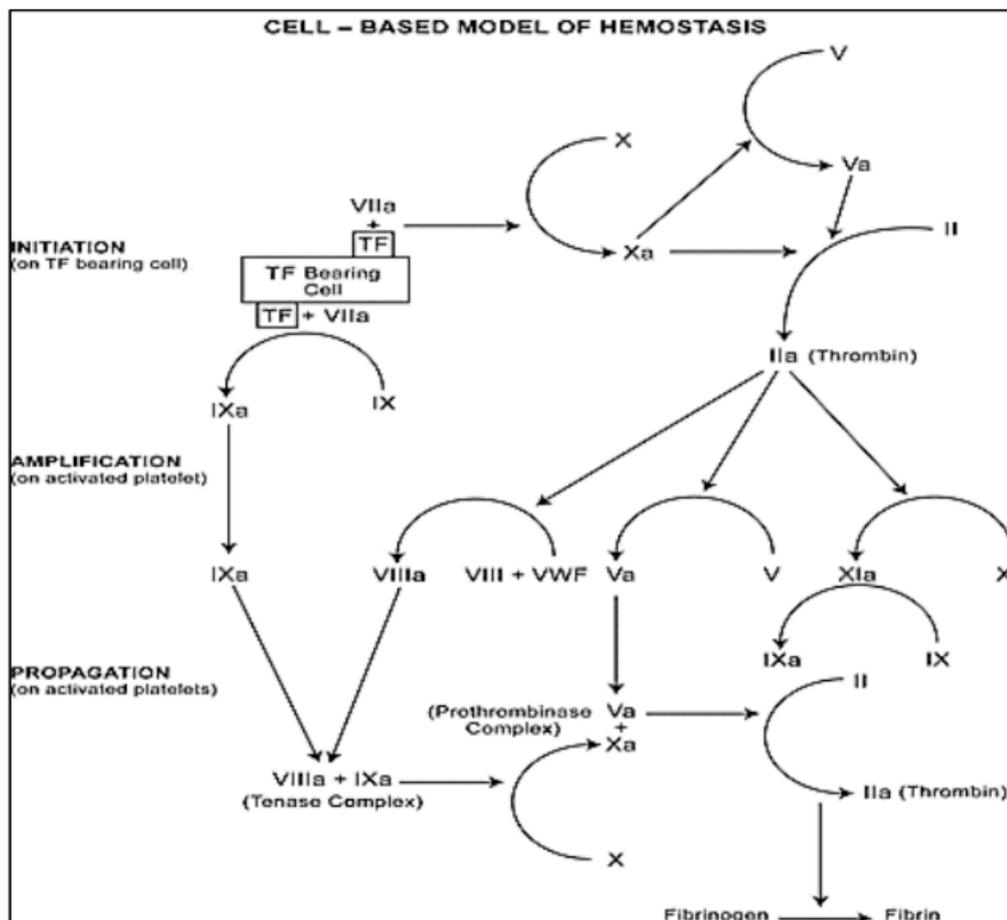


Figure 2 - **Scheme of the coagulation cascade to form the fibrin network.** Adapted from VINE A. K. (2009).

Coagulation is an essential phenomenon for maintaining hemostasis. It occurs through the mediation of serine proteases, cofactors, cell receptors and protease inhibitors. Most of the factors in coagulation cascade are serine proteases or cofactors (except for factors V and VIII, which are glycoproteins and factor XIII, a transglutaminase). Coagulation has the goal of promoting the formation of the fibrin network or the “clot” (HOFFBRAND, PETTIT & MOSS, 2013; VINE, 2009).

Coagulation was initially described as occurring in two pathways, intrinsic and extrinsic, which are processes that consist of proteolytic cascades, eventually converging on a common path that generates the thrombus. Subsequent studies have proposed a model of hemostasis with 4 overlapping stages: initiation, amplification, propagation and termination, in which coagulation factors are regulated by the properties of cell surfaces (Figure 2).

During normal homeostatic conditions, the human body maintains a constant balance between the formation of thrombi and their destruction. This balance is maintained by a complex interaction between platelets, the vascular endothelium, the coagulation cascade and the fibrinolytic system.

The class of proteases involved in the coagulation cascade is an important information to understand the mechanism of action of regulatory molecules as well as exogenous

factors that may interfere directly or indirectly in this entire process. Among the most important serine proteases that act in the coagulation cascade are some coagulation factors (II, VII, IX, X, XI, XII for example), the vasodilating molecule kallikrein, which is also a serine protease that acts on various substrates releasing vasoactive peptides, thus exercising their natural functions (MAAS; RENNE, 2018; VINE, 2009).

The biochemical reactions of blood clotting must be strictly regulated, in order to avoid excessive activation of the system, leading to inadequate fibrin formation and, as a possible consequence, vascular obstruction. In fact, the activity of proteases operating in the activation of coagulation is regulated by numerous inhibitory proteins, which act as natural anticoagulants (RAFT et al., 2015).

Diseases related to some type of dysfunction and / or dysregulation in the components of the coagulation cascade, generate major problems that are used as arguments for further research in this area. In this scenario, the use of inhibitors with anticoagulant action has been the subject of several studies. In a study carried out with a “Kunitz” inhibitor, obtained from heterologous expression in *Pichia pastoris*, it was proven that the main action in protecting against the formation of brain thrombi in rats came from the active domain of the inhibitor (XU et al., 2017). In another study, it was demonstrated that the specific amino acid residues that make up some inhibitory proteins can be used as an anticoagulant due to their action on the common coagulation pathway, mainly in the inhibition of factor Xa (ZHU et al., 2017).

Many other inhibitors of serine proteases of various origins can interfere in the blood coagulation cascade, such as, for example, the Kazal inhibitor present in the hematophagous bug proboscis, *Dipetalogaster maximus*, that is responsible for inhibiting thrombin, indicating its possible role in feeding this insect. Therefore, these inhibitors derived from different sources may be used in clinical pharmacology as anticoagulant agents (RAMALHO, L. G., SASSAKI, 2014).

Synthetic molecules derived from natural inhibitors are also widely used in the clinic against coagulopathies and in surgical interventions, such as bivaluridine, an oligopeptide analogous to hirudin that is naturally produced by leeches and binds reversibly to thrombin. This molecule has been shown to be much more efficient than heparin in preventing excessive bleeding in vascular surgeries and its cost is more accessible (ANDREOU; MANIOTIS; KOUTOUZIS, 2017; R., 2000).

### **1.3 Protease inhibitors and inflammatory process**

The processes that govern inflammatory reactions are vital for the body. It is already well known that in some cases of morbidity / lethality of individuals there is a relationship with some dysfunction in specific processes in the inflammation pathways. Thus, the inflammatory process works on a complex regulation system, responsible for preventing undue activation and / or an exacerbated reaction in the face of an injury that does not

represent a real danger to the organism, promoting the inactivation of effector elements, prolonging and closing the process (BARRINGTON et al., 2001; GRANGER DN, 2010).

Inflammation is a classical well-recognized essential step for the control of microbial invasion or tissue injury as well as for the maintenance of tissue homeostasis under various noxious conditions (MEDZHITOV, 2010; SCRIVO ET AL, 2011; MANCEK-KEBER, 2014). The causes of inflammation are numerous and varied: infectious agent, inert foreign substance, physical agent, posttraumatic cytotoxic injury, etc. Inflammation begins with a 'recognition' reaction involving certain cells of the body (monocytes, macrophages, lymphocytes), or circulating proteins (antibodies, complement proteins, Hageman factor, etc.).

The polymorphic nuclear neutrophil represents between 35 to 75% of the circulating immune system cell population, being the most abundant white blood cell in mammals (THEILGAARD-MÖNCH; PORSE; BORREGAARD, 2006). Among other molecules, the neutrophil secretes serine proteases such as neutrophil elastase (NE1), proteinase 3 (PR3), and cathepsin G (CG), which are components of one of the most important molecular arsenals for the defense of the organism, participating in the non-oxidative pathway intracellular and destruction of pathogens outside the cells (Figure 3) (MEYER-HOFFERT; WIEDOW, 2011).

During the phagocytosis event there is a great demand for neutrophils, thus, HNE, PR3 and CG are released into the extracellular space as the main proteases. Due to the high proteolytic activity of these enzymes, their activity seems to be well regulated, both in the intracellular and in the pericellular space to avoid the degradation of important structures such as connective

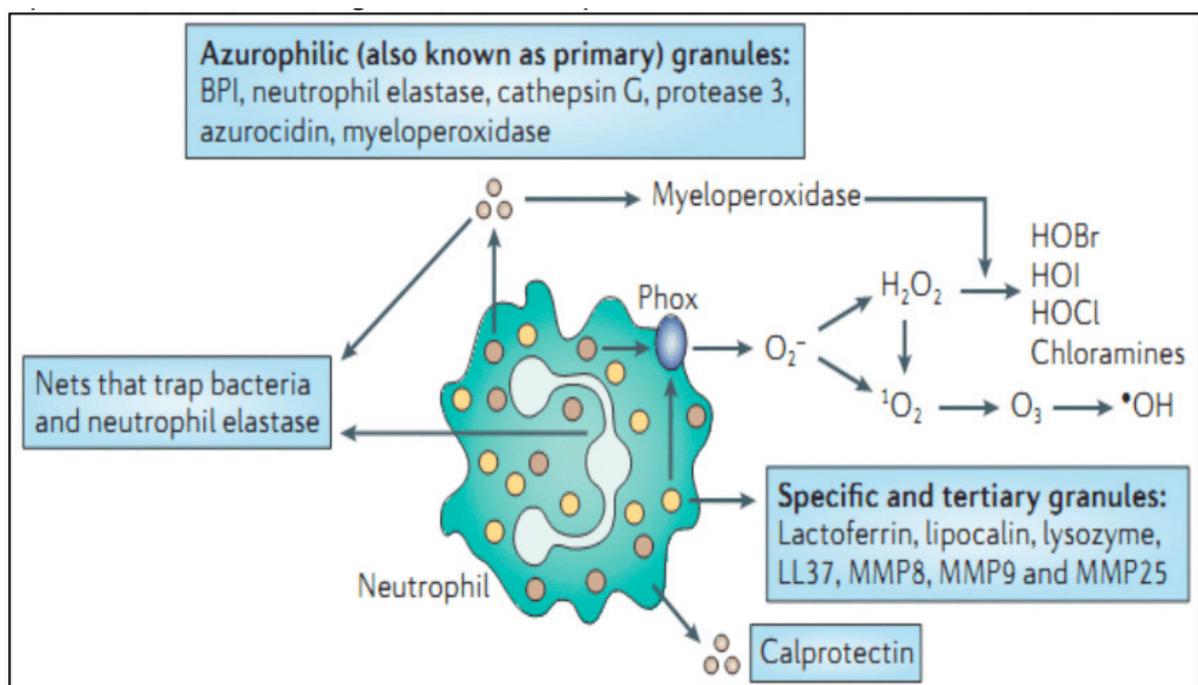


Figure 3 - Example of molecular arsenal of neutrophils in response to injuries. Figure adapted from Carl Nathan (2006).

tissue proteins including, collagen, proteoglycans, elastin (JANOFF, 1985). There are families of protease inhibitors such as serpins and macroglobulins that are closely linked in the control of the proteolytic activity of HNE, PR3 and CG. The individual contributions of these families will depend on their location in the tissue and what are their target proteases (BRICE KORKMAZ, MARSHALL S. HORWITZ, DIETER E. JENNE, 2010).

Recent studies have shown inhibitors that have an inhibitory action for the mentioned proteases are of great therapeutic interest, since this type of molecule is involved in several inflammatory diseases, including chronic obstructive pulmonary diseases (COPD), asthma and cystic fibrosis. These inhibitors act on elastase-type enzymes, for example, which are a class of serine proteinases that enzymatically degrade elastin (OSSOVSKAYA; BUNNETT, 2004).

In the search for alternatives for the treatment of pathologies that have serine proteases, elastase, proteinase 3 and cathepsin G in their pathological processes, a field of studies focused on natural products has shown promising. Some studies report the presence of elastase inhibitors, for example, in seeds of plants of different classes (LYU et al., 2018; RIBEIRO et al., 2010; ROCCO et al., 2011; SUMIKAWA et al., 2006). These inhibitors can be used in the clinic in many ways to prevent or treat diseases related to disorders in the inflammatory process.

## REFERENCES

- ABBENANTE, G.; FAIRLIE, D. **Protease Inhibitors in the Clinic**. Medicinal Chemistry, v. 1, n. 1, p. 71–104, 2006.
- ANDREOU, C.; MANIOTIS, C.; KOUTOUZIS, M. **The Rise and Fall of Anticoagulation with Bivalirudin During Percutaneous Coronary Interventions: A Review Article**. Cardiology and Therapy, v. 6, n. 1, p. 1–12, 2017.
- BARRINGTON, R. et al. **The role of complement in inflammation and adaptive immunity**. Immunological Reviews, v. 180, n. 1, p. 5–15, 2001.
- BLISNICK, A. A.; FOULON, T.; BONNET, S. I. **Serine protease inhibitors in ticks: An overview of their role in tick biology and tick-borne pathogen transmission**. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, v. 7, n. MAY, p. 1–24, 2017.
- BRICE KORKMAZ, MARSHALL S. HORWITZ, DIETER E. JENNE, AND F. G. **Neutrophil Elastase, Proteinase 3, and Cathepsin G as Therapeutic Targets in Human Diseases**. Pharmacological Reviews, v. 62, n. 4, p. 726–759, 2010.
- DOS SANTOS, E. A. et al. **Affinity Chromatography as a Key Tool to Purify Protein Protease Inhibitors from Plants**. Affinity Chromatography, 2012.
- GIORDANO, S. et al. **The current understanding of trauma-induced coagulopathy (TIC): a focused review on pathophysiology**. Internal and Emergency Medicine, v. 12, n. 7, p. 981–991, 2017.
- GRANGER DN, S. E. Inflammation and the Microcirculation. Morgan & Claypool Publishers, 2010.

- HUSSAIN, S. H. et al. **Phytochemicals from the aerial parts of *Ligularia thomsonii* and their radical scavenging activity.** *Phytochemistry Letters*, v. 7, n. 1, p. 6–10, 2014.
- JANOFF, A. **Elastase in Tissue Injury.** *Annual Review of Medicine*, v. 36, n. 1, p. 207–216, 1985.
- LASKOWSKI, M.; QASIM, M. A. **What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes?** *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, v. 1477, n. 1–2, p. 324–337, 2000.
- LÓPEZ-OTÍN, C.; BOND, J. S. **Proteases: Multifunctional enzymes in life and disease.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, n. 45, p. 30433–30437, 2008.
- LU, W. et al. **Binding of amino acid side-chains to S1 cavities of serine proteinases.** *Journal of molecular biology*, v. 266, n. 2, p. 441–461, 1997.
- LYU, P. et al. **Identification and pharmaceutical evaluation of novel frog skin-derived serine proteinase inhibitor peptide–PE-BBI (Pelophylax esculentus Bowman-Birk inhibitor) for the potential treatment of cancer.** *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 2–11, 2018.
- MAAS, C.; RENNE, T. **Coagulation factor XII in thrombosis and inflammation.** *Blood*, v. 131, n. 17, p. 1903–1909, 2018.
- MANCEK-KEBER M. **Inflammation-mediating proteases: structure, function in (patho) physiology and inhibition.** *Protein Pept Lett.*, 21(12), p. 1209–1229, 2014.
- MANDAL, S. et al. **Precursor of the inactive 2S seed storage protein from the Indian mustard *Brassica juncea* is a novel trypsin inhibitor. Characterization, post-translational processing studies, and transgenic expression to develop insect-resistant plants.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 40, p. 37161–37168, 2002.
- MEDZHITOV R. **Inflammation 2010: new adventures of an old flame.** *Cell*, 140(6), p. 771–776, 2010.
- MEYER-HOFFERT, U.; WIEDOW, O. **Neutrophil serine proteases: Mediators of innate immune responses.** *Current Opinion in Hematology*, v. 18, n. 1, p. 19–24, 2011.
- OSSOVSKAYA, V. S.; BUNNETT, N. W. **Protease-Activated Receptors: Contribution to Physiology and Disease.** *Physiological Reviews*, v. 84, n. 2, p. 579–621, 2004.
- PAIVA, P. M. G. et al. **Protease inhibitors from plants : Biotechnological insights with emphasis on their effects on microbial pathogens.** *n. Figure*, p. 641–649, 2013.
- POWERS, J. C., ASGIAN, J. L., EKICI, O. D., AND JAMES, K. E. **Irreversible Inhibitors of Serine, Cysteine, and Threonine Proteases.** *Chemical Reviews*, v. 102, p. 4639–4750, 2002.
- RAFT, J., GUERCI, P., HARTER, V., FUCHS-BUDER, T., & MEISTELMAN, C. **Biological evaluation of the effect of sugammadex on hemostasis and bleeding.** *Korean Journal of Anesthesiology*. vol. 68, no. 1.p. 17-21. 2014.
- RAMALHO, L. G., SASSAKI, S. D. **Estudo sobre inibidores de serinoproteases extraídos de artrópodes.** *banco de dados UFABC*, p. 5–8, 2014.
- RIBEIRO, J. K. C. et al. **New properties of the soybean trypsin inhibitor: Inhibition of human neutrophil elastase and its effect on acute pulmonary injury.** *European Journal of Pharmacology*, v. 644, n. 1–3, p. 238–244, 2010.

ROCCO, M. et al. **A Bowman-Birk inhibitor with anti-elastase activity from Lathyrus sativus L. seeds.** Molecular BioSystems, v. 7, n. 8, p. 2500–2507, 2011.

SANTOS, E. A. et al. **Affinity Chromatography as a Key Tool to Purify Protein Protease Inhibitors from Plants.** InTech, 2012.

SUMIKAWA, J. T. et al. **A Kunitz-type glycosylated elastase inhibitor with one disulfide bridge.** Planta Medica, v. 72, n. 5, p. 393–397, 2006.

THEILGAARD-MÖNCH, K.; PORSE, B. T.; BORREGAARD, N. **Systems biology of neutrophil differentiation and immune response.** Current Opinion in Immunology, v. 18, n. 1, p. 54–60, 2006.

TREMACOLDI, C. R. **Proteases e Inibidores de Proteases na Defesa de Plantas Contra Pragas.** p. 44, 2009.

VINE, A. K. **Recent advances in haemostasis and thrombosis.** Retina, v. 29, n. 1, p. 1–7, 2009.

XU, F. et al. **Mutation of the Kunitz-type proteinase inhibitor domain in the amyloid  $\beta$ -protein precursor abolishes its anti-thrombotic properties in vivo.** Thrombosis Research, v. 155, p. 58–64, 2017.

ZHU, Y. et al. **Identification of AcAP5 as a novel factor Xa inhibitor with both direct and allosteric inhibition.** Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 483, n. 1, p. 495–501, 2017.

## CRIOPRESERVAÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS DE EHRlich

Data de aceite: 01/07/2020

**Beatriz Tessaroto Buscarino**  
UMESP – buscarinob@gmail.com

**Silvia Regina Kleeb**  
UMESP – silvia.kleeb@metodista.br

**Carlos Pereira Araújo de Melo**  
UMESP – carlos.melo@metodista.br

**RESUMO:** A criopreservação permite que células sejam conservadas por tempo indeterminado, proporcionando a retomada do desenvolvimento celular normal após o armazenamento em nitrogênio líquido. O tumor de Ehrlich é uma neoplasia experimental transplantável de origem epitelial maligna, espécie-específica e atualmente é mantido em animais no biotério da Universidade Metodista de São Paulo. O projeto para criopreservação das células tumorais de Ehrlich, aprovado no CEUA/Metodista 180/17, visa diminuir o uso de animais vivos utilizados para a manutenção dessas células. Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*). Os animais foram alojados em caixas, com água e comida, e mantidos no biotério da Universidade Metodista de São Paulo – São Bernardo do Campo, com temperatura controlada e ciclo de iluminação claro-escuro de 12 x 12 h (início às 7 horas).

Os animais receberam alimentação e água “ad libitum”. As células tumorais de Ehrlich foram injetadas em um camundongo (0,1 mL) por via intraperitoneal e após 7 dias o líquido ascítico foi aspirado (2 mL). Dentre estes 2 mL, 1 mL foi diluído (1/200) para verificar a viabilidade das células tumorais e 1 mL foi dividido em nove eppendorfs, em três eppendorfs com o crioprotetor DMSO (200 µL DMSO + 600 µL RPMI + 200 µL células), três eppendorfs com a junção dos crioprotetores DMSO+glicerol (100 µL DMSO + 100 µL glicerol + 600 µL RPMI + 200 µL células) e mais três eppendorfs com o crioprotetor glicerol (200 µL glicerol + 600 µL RPMI + 200 µL células), com o objetivo de serem congelados. O descongelamento foi realizado em banho maria a 37°C por 5 minutos. Em um tubo cônico graduado foi colocado 7 mL de RPMI + o conteúdo da amostra. Após a mistura, o tubo cônico graduado foi posto na centrífuga em uma velocidade de 1.000 rotações durante 5 minutos. Ao finalizar a centrifugação, a fibrina ficou concentrada no interior do tubo. Do conteúdo do tubo cônico graduado foi utilizado 0,2 – 0,3 mL para injetar nos camundongos e 10 µL foi misturado com 90 µL do azul de Trypan para analisar no microscópio, por meio da câmara de Neubauer, a viabilidade das células. Este processo foi realizado com as amostras 20 e

40 dias após o seu congelamento. Após 20 dias de congelamento, um eppendorf de cada crioprotetor foi descongelado e inoculado em dois camundongos cada, totalizando seis camundongos, na amostra de DMSO havia 33% de células viáveis, na de DMSO+glicerol 0% de células viáveis e na de glicerol 0,79% de células viáveis. No entanto, após 14 dias foi observado crescimento tumoral em um camundongo de cada amostra e nos outros não houve crescimento tumoral. Após 40 dias de congelamento, mais um eppendorf de cada crioprotetor foi descongelado e inoculado em dois camundongos cada, na amostra de DMSO havia 23,61% de células viáveis, na de DMSO+glicerol 8,71% de células viáveis e na de glicerol 2,11% de células viáveis. Após 14 dias não foi observado crescimento tumoral em nenhum camundongo. A partir do experimento pode-se observar que o crioprotetor DMSO obteve um desempenho maior em manter as células viáveis, visto que pela análise microscópica foi o que obteve uma maior porcentagem de células viáveis. Com 20 dias de congelamento obteve-se um crescimento tumoral de 50% em todos os crioprotetores. Com 40 dias de congelamento não houve crescimento tumoral.

**PALAVRAS-CHAVE:** Tumor de Ehrlich, criopreservação, DMSO, glicerol, viabilidade de células, nitrogênio líquido.

### CRYOPRESERVATION OF EHRLICH TUMOR CELLS

**ABSTRACT:** The Ehrlich tumor is an experimental transplantable species-specific mouse neoplasm and its viability is currently possible through cell splitting in live animals at the vivarium of Universidade Metodista de São Paulo. The cryopreservation of Ehrlich tumor cells aims reducing the use of live animals in order to maintain the viability of these cells. The experiment was submitted and approved by CEUA-Metodista n° 189/17. Intraperitoneal injection of Ehrlich tumor cells was administered in receptor mice and ascitic fluid was collected after 7 days. About 200µL of this fluid was added to each cryoprotectant (200µL DMSO or 100µL DMSO+100µL glycerol or 200µL of glycerol) and 600µL of RPMI and the resulting compound was kept frozen for 20 and 40 days. The frozen cells were then thawed in a 37°C water bath for 5 minutes. The sample was added to a graduated tube with 7mL of RPMI. The mix was placed in a centrifuge with a speed setting of 200 rpm. Cell viability was evaluated by adding a Trypan Blue solution. Subsequently 0.3mL of this solution was inoculated into 6 animals. Tumor development in these animals was followed for 14 days. The following cell viability was found after analyzing the group of cells that were frozen for 20 days: DMSO 33%, DMSO+glycerol 0% e glycerol 0.79%. After 14 days of inoculation tumor growth was observed in only one of the mice of each sample. The procedure was repeated with the group of cells that were frozen for 40 days and the following cell viability was found: DMSO 23.61%, DMSO+glycerol 8.71% and glycerol 2.11%. After 14 days of inoculation no tumor growth was found in any of the mice. There was a considering variation of the cell viability when different protocols were used and when they were exposed to different times of cryopreservation. However, cryopreservation of cells was more efficient when only DMSO was used, with an

efficiency percentage of 33% and 23.61% after 20 and 40 days respectively. Tumor growth *in vivo* was observed in cells that were frozen for 20 days only. It is necessary to enhance this procedure in order to increase the cell viability and use it for cryopreservation in future research.

**KEYWORDS:** Ehrlich tumor, cryopreservation, DMSO, glycerol, cell viability, liquid nitrogen.

## 1 | INTRODUÇÃO

O tumor de Ehrlich é uma neoplasia transplantável maligna de origem epitelial e corresponde ao adenocarcinoma mamário de camundongo fêmea (Abdan, 2012), transplantado pela primeira vez por Paul Ehrlich, em 1906. Cresce em variadas espécies de camundongos, sob a forma ascítica quando inoculada na cavidade peritoneal e na forma sólida quando inoculada subcutaneamente. Os métodos atualmente utilizados para a manutenção *in vivo* do tumor são caros e dependem do uso de animais. Portanto, novos métodos para a preservação destas células tumorais precisam ser investigados e desenvolvidos (Santos; Kamila, 2015).

Pela capacidade das células tumorais de Ehrlich (CTE) de se proliferar em diversas espécies e por serem consideradas muito invasivas, o tumor tem sido utilizado como um modelo para vários estudos, tais como a influência do estresse sobre câncer (Palermo-Neto et al., 2001, Palermo-Neto et al., 2003), resposta imunológica ao tumor (Segura et al. 2000; Pinto, 2003), efeito antiangiogênico e antiproliferativo (Kumar et al., 2009; Islam, et al., 2012 Chougule et al., 2013), marcadores de proliferação celular (Silva et al., 2006), na avaliação do crescimento tumoral sob o efeito de toxinas (Mady, 2002), extratos vegetais (Rajeshkumar et al., 2002; Radhika et al., 2012), drogas anti-inflamatórias e agentes proteicos (Pal et al., 2001; Kar et al., 2012) e no estudo de neurotransmissores (Monshkov et al., 2013).

Apreservação criogênica é o ato de congelar e armazenar as células a uma temperatura muito baixa. O metabolismo celular cessa, e assim, quando as células são aquecidas e a água retorna ao estado líquido, a função celular retoma (Tedeschi; Paoli, 2011). Este método permite a redução do número de uso dos animais, assegurando a estabilidade genética e o armazenamento de células durante longos períodos de experimentação. Por outro lado, a criopreservação é um processo complexo que envolve muitos fatores que devem ser equilibrados para obter resultados satisfatórios (Santos; Kamila, 2015).

Um método de criopreservação é o ultra-rápida (vitrificação) constituído por exposição direta das células ao nitrogênio líquido ou a vapores, evitando assim a cristalização da água intracelular. Um dos princípios em que se baseia o método é refrigeração ultra-rápida das células imersas numa solução que incorpora os crioprotetores em alta concentração. A mistura a ser congelada não cristaliza, mas torna-se líquido viscoso e passa para um estado sólido (Fahy et al., 1984). Para evitar as injúrias induzidas pelas

baixas temperaturas é essencial o uso de agentes crioprotetores que proporcionem uma proteção celular e tecidual durante a redução da temperatura.

Este trabalho tem como objetivo avaliar a ação de crioprotetores como o dimetilsulfóxido (DMSO), o glicerol, bem como a associação de ambos na criopreservação de células tumorais de Ehrlich.

## **2 | MATERIAIS E MÉTODOS**

O presente trabalho é parte integrante de um projeto mãe e foi encaminhado e aprovado pela CEUA/Methodista sob número 180/17 em 13.11.2017.

### **2.1 Animais**

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*). Os animais foram alojados em caixas, com água e comida, e mantidos no biotério da Universidade Metodista de São Paulo – São Bernardo do Campo, com temperatura controlada e ciclo de iluminação claro-escuro de 12 x 12 h (início às 7 horas). Os animais receberam alimentação e água “ad libitum”.

### **2.2 Neoplasia transplantável**

O tumor de Ehrlich é uma neoplasia transplantável maligna de origem epitelial e corresponde ao adenocarcinoma mamário de camundongo fêmea (Abdan, 2012), transplantado pela primeira vez por Paul Ehrlich, em 1906. Cresce em variadas espécies de camundongos, sob forma ascítica quando inoculada na cavidade peritoneal e na forma sólida quando inoculada subcutaneamente. No presente trabalho foi utilizado o tumor na sua forma ascítica.

### **2.3 Crioprotetores**

O dimetilsulfóxido (DMSO) é um importante agente crioprotetor que possui alta capacidade de penetrar na célula devido ao fato de ser um solvente orgânico de baixo peso molecular (78 g/mol) e temperatura de congelação de 18,5 °C. É um subproduto de fácil acesso, podendo ser extraído da celulose. A composição química do DMSO permite a interação ou combinação com ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos, proteínas e muitas drogas sem alterar de forma irreversível a configuração das moléculas. O DMSO age interagindo com as membranas, atravessando-as rapidamente por meio de difusão (Castro, 2011).

O glicerol (CH<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>) é um álcool polihídrico altamente permeável com peso molecular 92,10 g mol<sup>-1</sup> (Silva et al., 2003). Sua atividade de crioproteção foi inicialmente aplicada em 1913, quando Keith observou que a sua adição em variadas concentrações

(5-42%) em suspensão de *Escherichia coli* permitiu mantê-la viável por seis meses à temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O glicerol penetra à membrana celular através da difusão passiva, permanecendo tanto na membrana quanto no citoplasma (Parks & Graham, 1992). Sua difusão é de 30 a 60 vezes mais lenta que a da água (Graham, 1996). Os efeitos protetores do glicerol são representados por propriedades coligativas, diminuição do ponto de congelamento com conseqüente redução das concentrações de eletrólitos na fração não congelada da amostra (Lovelock & Polge, 1954).

## 2.4 Delineamento experimental

As células tumorais de Ehrlich foram injetadas em um camundongo (0,1 mL) por via intraperitoneal e após 7 dias o líquido ascítico foi aspirado (2 mL). Dentre estes 2 mL, 1 mL foi diluído (1/200) para verificar a viabilidade das células tumorais e 1 mL foi utilizado para o congelamento com os crioprotetores e descongelados para análise de células após 20 dias e 40 dias.

### 2.4.1 Diluição do tumor de Ehrlich (1/200)

A diluição (Figura 1) é realizada para que possa ser feita a contagem das células. Para o procedimento foram utilizados três eppendorfs, RPMI (meio de cultura) e azul de Trypan.

Eppendorf 1: foi misturado  $200\text{ }\mu\text{L}$  do líquido ascítico com  $200\text{ }\mu\text{L}$  de RPMI.

Eppendorf 2: foi misturado  $100\text{ }\mu\text{L}$  do conteúdo do eppendorf 1 com  $900\text{ }\mu\text{L}$  de RPMI.

Eppendorf 3: foi misturado  $10\text{ }\mu\text{L}$  do conteúdo do eppendorf 2 com  $90\text{ }\mu\text{L}$  do azul de Trypan.

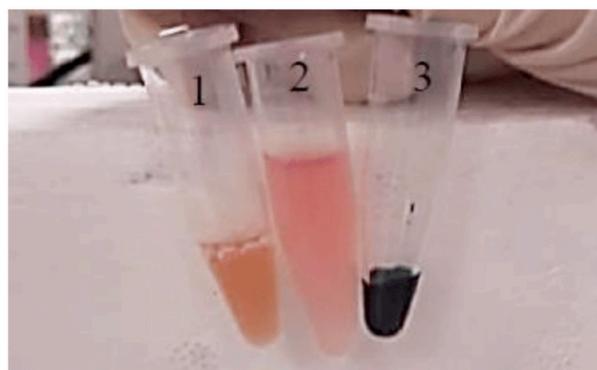


Figura 1: A figura demonstra o processo de diluição do tumor de Ehrlich, sendo representados os eppendorfs de 1 a 3 da esquerda para a direita.

### 2.4.2 Contagem de células viáveis

Após a diluição, o material do eppendorf 3 foi analisado por microscopia, com o auxílio da câmara de Neubauer, para a contagem das células vivas.

O azul de Trypan foi utilizado para discernir a viabilidade da célula, caso ela não seja

viável, sua membrana perde a permeabilidade e o azul de Trypan infiltra fazendo com que a célula adquira uma tonalidade azul (Figura 2A). Já com a célula viável isto não ocorre (Figura 2B).

Com a contagem na câmara de Neubauer foram obtidos os seguintes resultados:

Q1 = 1º Quadrante: 64 células viáveis.

Q2 = 2º Quadrante: 48 células viáveis.

Q3 = 3º Quadrante: 52 células viáveis.

Q4 = 4º Quadrante: 65 células viáveis.

$$\text{Fórmula: } \frac{Q1+Q2+Q3+Q4}{4} \times 10.000$$

$$\text{Conta: } \frac{64+48+52+65}{4} \times 10.000 = 572.500 \text{ células viáveis.}$$

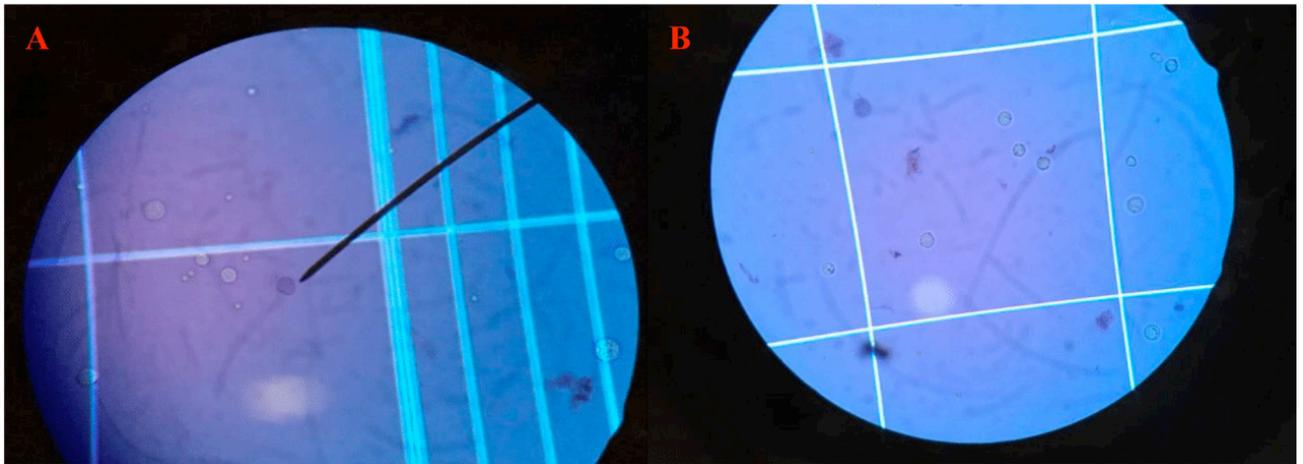


Figura 2: A figura demonstra em: A. Fotomicrografia de célula não viável (indicada pela ponteira) devido a penetração do azul de Trypan. B. Fotomicrografia de células viáveis sem a penetração do azul de Trypan.

### 2.4.3 Crioprotetores e congelamento

O experimento foi dividido em três grupos cada um com um crioprotetor, no grupo A continha DMSO, o grupo B glicerol e o grupo C DMSO+glicerol. O congelamento foi realizado em nitrogênio líquido a uma temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Grupo A: em dois eppendorfs (A1 e A2) foram colocados  $200 \mu\text{L}$  de DMSO +  $600 \mu\text{L}$  de RPMI +  $200 \mu\text{L}$  de líquido ascítico com células tumorais.

Grupo B: em dois eppendorfs (B1 e B2) foram colocados  $200 \mu\text{L}$  de glicerol +  $600 \mu\text{L}$  de RPMI +  $200 \mu\text{L}$  de líquido ascítico com células tumorais.

Grupo C: em dois eppendorfs (C1 e C2) foram colocados  $100 \mu\text{L}$  de DMSO +  $100 \mu\text{L}$  de glicerol +  $600 \mu\text{L}$  de RPMI +  $200 \mu\text{L}$  de líquido ascítico com células tumorais.

#### 2.4.4 Descongelamento

O descongelamento foi realizado em banho maria a 37°C por 5 minutos. Em um tubo cônico graduado foi colocado 7 mL de RPMI + o conteúdo do eppendorf. Após a mistura, o tubo cônico graduado foi posto na centrífuga em uma velocidade de 1.000 rotações durante 5 minutos. Ao finalizar a centrifugação, a fibrina ficou concentrada no interior do tubo. Do conteúdo do tubo cônico graduado foi utilizado 0,2 – 0,3 mL para injetar em dois novos camundongos para analisar o crescimento tumoral e 10 µL foi misturado com 90 µL do azul de Trypan para analisar no microscópio, por meio da câmara de Neubauer, a viabilidade das células. Este processo foi realizado com os eppendorfs A1, B1 e C1 20 dias após o congelamento e com os eppendorfs A2, B2 e C2 40 dias após o congelamento.

### 3 | RESULTADOS

Após 20 dias de congelamento em nitrogênio líquido os eppendorfs A1, B1 e C1 foram descongelados e foi feita a análise microscópica para realizar a contagem de células viáveis.

O eppendorf A1 que continha o crioprotetor DMSO apresentou uma média de 222.500 (33%) de células viáveis e uma média de 445.000 (66%) de células não viáveis.

O eppendorf B1 que continha o crioprotetor glicerol apresentou uma média de 7.500 (0,79%) de células viáveis e uma média de 932.500 (99,20%) de células não viáveis.

O eppendorf C1 que continha os crioprotetores DMSO+glicerol apresentou 0 (0%) de células viáveis e uma média de 110.000 (100%) de células não viáveis.

Para análise de crescimento tumoral o conteúdo de cada eppendorf foi injetado em dois novos camundongos e eles foram pesados antes e após 14 dias da injeção das células tumorais.

Camundongos	Peso inicial	Peso após injeção das células tumorais
<b>I (eppendorf A1)</b>	40 gramas	43 gramas
<b>II (eppendorf A1)</b>	50 gramas	50 gramas
<b>III (eppendorf B1)</b>	41 gramas	42 gramas
<b>IV (eppendorf B1)</b>	43 gramas	47 gramas
<b>V (eppendorf C1)</b>	43 gramas	44 gramas
<b>VI (eppendorf C1)</b>	46 gramas	48 gramas

Tabela 1: A tabela representa o peso dos camundongos antes e após 14 dias da primeira injeção das células tumorais. Observa-se que houve ganho de peso em todos os camundongos, exceto o camundongo II.

Após 40 dias de congelamento em nitrogênio líquido os eppendorfs A2, B2 e C2 foram descongelados e foi feita a análise microscópica para realizar a contagem de células viáveis.

O eppendorf A2 que continha o crioprotetor DMSO apresentou uma média de 372.500 (23,61%) de células viáveis e uma média de 1.205.000 (76,39%) de células não viáveis.

O eppendorf B1 que continha o crioprotetor glicerol apresentou uma média de 20.000 (2,11%) de células viáveis e uma média de 927.500 (97,89%) de células não viáveis.

O eppendorf C1 que continha os crioprotetores DMSO+glicerol apresentou 72.500 (8,71%) de células viáveis e uma média de 760.000 (91,29%) de células não viáveis.

Para análise de crescimento tumoral o conteúdo de cada eppendorf foi injetado em dois novos camundongos e eles foram pesados antes e após 14 dias da injeção das células tumorais.

Camundongos	Peso inicial	Peso após injeção das células tumorais
<b>I (eppendorf A1)</b>	35 gramas	35 gramas
<b>II (eppendorf A1)</b>	37 gramas	34 gramas
<b>III (eppendorf B1)</b>	45 gramas	45 gramas
<b>IV (eppendorf B1)</b>	33 gramas	33 gramas
<b>V (eppendorf C1)</b>	36 gramas	40 gramas
<b>VI (eppendorf C1)</b>	42 gramas	46 gramas

Tabela 2: A tabela representa o peso dos camundongos antes e após 14 dias da segunda injeção das células tumorais. Observa-se que não houve ganho de peso na maioria dos camundongos, apenas nos camundongos V e VI.

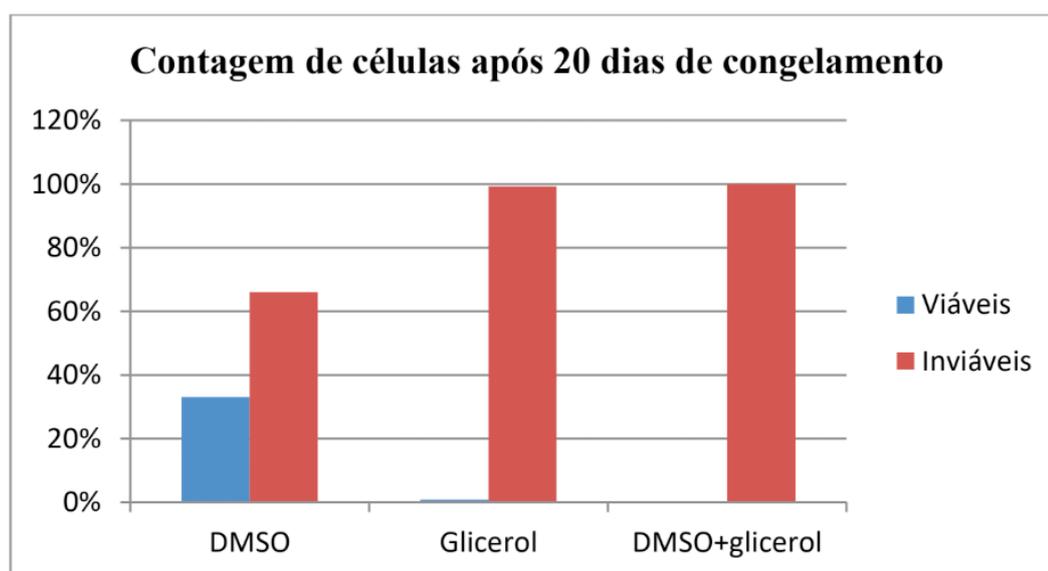


Figura 3: O gráfico mostra a porcentagem de células viáveis e inviáveis nos crioprotetores DMSO, glicerol e DMSO+glicerol após 20 dias de congelamento.

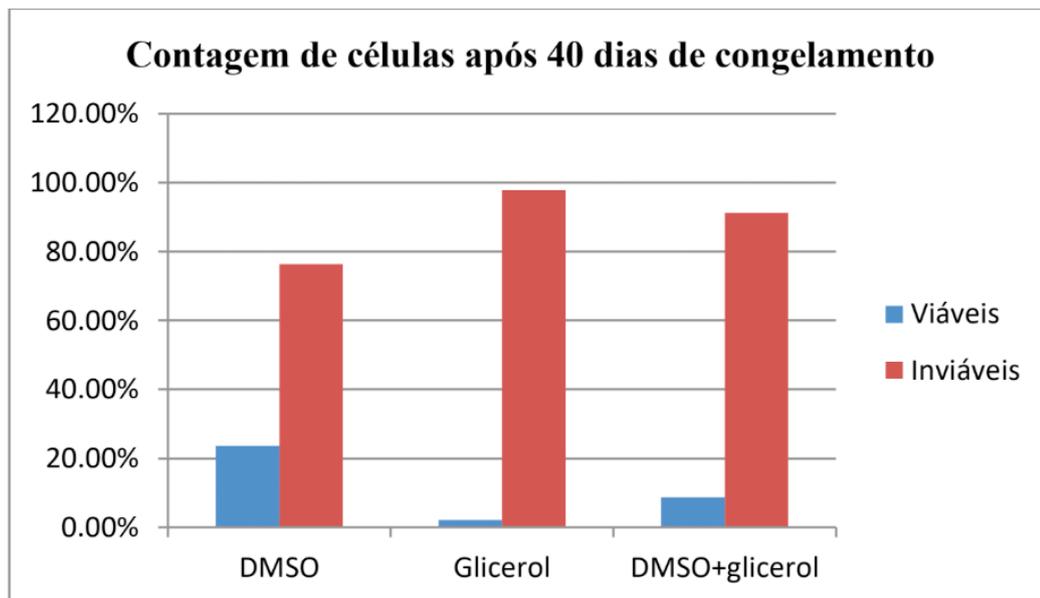


Figura 4: O gráfico mostra a porcentagem de células viáveis e inviáveis nos crioprotetores DMSO, glicerol e DMSO+glicerol após 40 dias de congelamento.

#### 4 | DISCUSSÃO

Sabe-se que diferentes tipos de células podem precisar de diferentes protocolos de congelamento para que se obtenha sucesso no processo de criopreservação (LEIBO; MAZUR, 1971). Deste modo, é preciso considerar diversos fatores, tais como: morfologia das células, velocidade de congelamento, pH, estresse osmótico e tipo e concentração do agente crioprotetor, sendo este último um fator imprescindível (MAZUR, 1963; SANTOS et al., 2015).

Os crioprotetores fornecem proteção celular ao reduzirem as diferenças de osmolaridade entre os meios intra e extracelular (MERYMAN, 2007). A baixa taxa de viabilidade celular em nosso estudo indica que as CTE sofreram efeitos deletérios durante o processo de criopreservação. É conhecido que este processo induz danos à membrana celular, o que torna ainda mais importante o uso de crioprotetores, para que a desidratação celular seja facilitada, aumentando a permeabilidade da membrana à água e, com isso, a redução na formação de cristais de gelo intracelulares (SANTOS et al., 2015). Akhoondi et al. (2012), constataram que a permeabilidade à água é maior com DMSO quando comparado ao glicerol, assim ressaltando a capacidade do DMSO em diminuir a incidência dos cristais de gelo intracelulares.

A variação do peso corporal é utilizada como uma forma de avaliação do crescimento tumoral (SILVA; FREITAS; DOMINGUES, 2017). Enquanto a perda de peso tenha sido um parâmetro para medir a agressividade de proliferação do tumor de Ehrlich (SANTOS et al., 2015), nossos resultados apresentaram aumento de peso nos camundongos que chegaram a desenvolver o tumor, fato que pode ser explicado pela retenção de líquidos que ocorre na proliferação desse tumor (SILVA; FREITAS; DOMINGUES, 2017).

Os resultados das CTE criopreservadas com DMSO se apresentaram promissores,

uma vez que dentre os crioprotetores utilizados foi o que apresentou uma maior taxa de viabilidade (33%) após 20 dias, bem como crescimento tumoral e um dos camundongos utilizados. Após 40 dias de congelamento houve uma taxa de 23,61% de células viáveis, porém não houve crescimento tumoral.

Segundo Oliveira et al. (2010, p. 4) “Apesar de apresentar uma viabilidade de aproximadamente 25%, o crioprotetor Glicerol é considerado eficaz quando utilizado na criopreservação das células tumorais de Ehrlich”. Por outro lado, apesar de apresentar uma viabilidade de apenas 0,79%, o tumor conseguiu se desenvolver em um dos camundongos. Após 40 dias de congelamento apresentou uma taxa de viabilidade maior, 2,11%, no entanto, não houve crescimento tumoral.

Com a associação de DMSO+glicerol a taxa de viabilidade celular após 20 dias de congelamento foi de 0%, no entanto, um dos camundongos apresentou crescimento tumoral, sugerindo presença de células viáveis. Após 40 dias de congelamento a porcentagem de células viáveis foi de 8,71% e apesar de os camundongos apresentarem ganho de peso, não houve crescimento tumoral.

O desenvolvimento do tumor em apenas um dos camundongos de cada experimento suscita o questionamento de que a quantidade de 0,3 mL inoculada não seja suficiente para garantir a proliferação do tumor no animal. Segundo o Manual Básico de Oncologia Experimental Tumor de Ehrlich (2018), como a via de inoculação intraperitoneal suporta grandes volumes, a quantidade de células inoculadas é em média de 0,5 mL, garantindo o desenvolvendo do tumor na forma ascítica.

## 5 | CONCLUSÃO

A técnica desenvolvida na criopreservação das células tumorais de Ehrlich apresentou resultados positivos após 20 dias de congelamento apesar do baixo número de células viáveis, desenvolvendo o tumor em um camundongo de cada experimento (DMSO, glicerol e DMSO+glicerol). De acordo com os resultados o DMSO se mostrou mais eficaz apresentando uma maior taxa de viabilidade e quantidade de células. No entanto, futuros estudos e experimentos são necessários para o aprimoramento da técnica realizada, almejando prolongar o tempo de criopreservação e, conseqüentemente, a redução no uso de animais.

## REFERÊNCIAS

ABDAN, M. Alfa-lipoic acid controls tumor growth and modulates hepatic redox state in Ehrlich-ascites-carcinoma-bearing mice. **Scientific World Journal**, 2012: 509838.

AGUIAR, T.D.F.; TEIXEIRA, M.F.S.; TELES, C.H.A.; MARTINS, G.R.; JÚNIOR, R.Q.B.; COSTA, E.C. Princípios básicos da criomicrobiologia: enfoque nos tipos de micro-organismos e nos principais agentes crioprotetores. **Acta Veterinária Brasilica**, v.6, p.80-93, 2012.

ALVES, S. P.; MELO, C. P. A. Criopreservação das células tumorais de ehrlich com dimetilsulfóxido em nitrogênio líquido. **Universidade Metodista de São Paulo**, 07-11, 2018.

CASTRO, S.V.; CARVALHO, A.A.; SILVA, C.M.G. Intracellular Cryoprotectant Agents: Characteristics and Use of Ovarian Tissue and Oocyte Cryopreservation. 2011. **Acta Scientiae Veterinariae**. 39(2): 957.

FAHY, G.; MACFARLANE, D. R.; ANGELL, C. A.; MERYMAN, H. T. Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, 21(4):407-26, 1984.

JACO, L.S.; MELO, C. P. A. Avaliação do glicerol na criopreservação das células tumorais de ehrlich. **Universidade Metodista de São Paulo**, 08-12, 2018.

KUMAR, A.; D'SOUZA, S.S.; NAGARAJ, S.R.; GAONKAR, S.L.; SALIMATH, B.P.; RAI, K.M. Antiangiogenic and antiproliferative effects of substituted-1,3,4-oxadiazole derivatives is mediated by down regulation of VEGF and inhibition of translocation of HIF-1alpha in Ehrlich ascites tumor cells. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology Journal**. v.64, p.1221-33, 2009.

MADY, E.A. Antitumor and biochemical effects of Echis coloratus Crude venom on Ehrlich ascite carcinoma cells in vivo. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v.8, p.283-296, 2002.

MOSHKOV, D.A.; ROMANCHENKO, S.P.; PARNYSHKOVA, E.Y.; BEZGINA, E.N.; ZAICHKINA, S.I.; PAVLIK, L.L. Effect of dopamine on Ehrlich ascites carcinoma cells. **Cancer Biol Med**. V.9, p.242-247, 2012

PAL, S.; CHOUDHURI, T.; CHATTOPADHYAY, S.; BHATTACHARYA, A.; DATTA, G.K.; DAS, T. and SA, G. Mechanisms of curcumininduced apoptosis of Ehrlich's ascites carcinoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications Journal**, v. 288, p. 658-665, 2001.

PALERMO-NETO, J.; MASSOCO, C.O.; SOUZA, W.R. Effects of physical and psychological stressors on behaviour, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Brain, Behavior, and Immunity Journal**, v.17, p. 43-54, 2003.

PEGG, D. E. **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols Methods**. In: Molecular Biology. 2nd edn. Totowa, 2007: Humana Press Inc., 348p.

RAJESHKUMAR, N.V.; JOY, K.L.; KUTTAN, G.; RAMSEWAK, R.S.; NAIR, M.G. and KUTTAN, R. Antitumour and anticarcinogenic activity of Phyllanthus amarus extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 17-22, 2002.

SANTOS, M., KAMILA; **Evaluation of Different Methods of Cryopreservation of Ehrlich Tumor Cells**. Belo Horizonte: Research Gate, 2015.

SEGURA, J.A., BARBERO, L.G., MÁRQUEZ, J. Ehrlich ascites tumour unbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B stimulation. **Immunology Letters**, v. 74, p. 111– 115, 2000.

SILVA, A.E.; SANTOS, F.G.A.; CASSALI, G.D. Marcadores de proliferação celular na avaliação do crescimento do tumor sólido e ascítico de Ehrlich. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.658-661, 2006.

TEDESCHI, R.; PAOLI, P. Collection and preservation of frozen microorganisms. **Methods in Molecular Biology Journal**, p. 313-326, 2011.

## ANÁLISE BIBLIOGRÁFICA DE microRNAs ENVOLVIDOS POR INFECÇÕES POR ARBOVIROSES DA FAMÍLIA FLAVIVIRIDAE

*Data de aceite: 01/07/2020*

*Data de submissão: 27/03/2020*

### **Marcos Daniel Mendes Padilha**

UNAMA (Universidade da Amazônia) CCBS-  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Belém-Pará

<http://lattes.cnpq.br/7402939637915735>

### **Gustavo Moraes Holanda**

UNAMA (Universidade da Amazônia) CCBS-  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Belém-Pará

<http://lattes.cnpq.br/6454563520643168>

### **Ludmilla Ferreira Costa**

UNAMA (Universidade da Amazônia) CCBS-  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Belém-Pará

<http://lattes.cnpq.br/8378033598712363>

**RESUMO:** Introdução: Os arbovírus são transmitidos aos humanos por artrópodes hematófagos e tem se propagado em populações na África, Ásia e nas Américas. Vários estudos demonstraram que a infecção por patógenos altera o perfil de expressão de microRNAs. Essas moléculas são transcritas pela RNA polimerase II, após a transcrição, os microRNAs são processados por uma RNase III

chamada DROSHA e uma proteína de ligação ao RNA dupla fita DGCR8; a DICER se associa a proteína TRBP (proteína de ligação a RNA responsiva a ativação gênica), com as proteínas argonautas (AGO1, AGO2, AGO3 ou AGO4) na montagem do complexo ribonucleoproteico. Neste estudo, avaliamos os perfis de expressão dos microRNAs relacionados com os processos de infecção por vírus da família Flaviviridae em células humanas. Objetivo: Elucidar através da revisão de literatura os processos infecciosos envolvendo microRNAs induzidos por flavivírus no hospedeiro. Métodos: Foram buscados artigos na plataforma NCBI, SciELO, Periódicos CAPES, buscando os seguintes termos: microRNAs, arbovírus, flavivírus. Resultados e Discussão: Verificou-se que microRNAs são pequenas sequências não codificantes que podem interferir na replicação de alguns vírus em zonas pós-transcricionais, de numerosas vias celulares incluindo as associadas à patogênese. Dentre os fatores podemos destacar a regulação de citocinas transformando o fator de crescimento beta (TGF- $\beta$ ), fator de necrose do tumor Alpha (TNF- $\alpha$ ), e interferon Gamma (IFN- $\gamma$ ) que estão envolvidos no processo apoptótico da infecção. Um dos eventos descritos é que o miR-122 inibi a expressão da DICER e conseqüentemente

este miR-122 não é produzido e a replicação viral não é processada corretamente. Conclusão: Observamos que microRNAs são capazes de induzir ou inibir a replicação de certos flavivírus, possuindo potencial de uso em procedimentos de terapia gênica o que permite alcançar um mecanismo capaz de coibir a replicação de vírus como Zika, febre amarela, Dengue, colaborando com a qualidade de vida das pessoas.

**PALAVRAS-CHAVE:** MicroRNAs; ARBOVÍRUS; FLAVIVÍRUS.

## BIBLIOGRAPHIC ANALYSIS OF microRNAs INVOLVED BY INFECTIONS BY ARBOVIROSES OF THE FLAVIVIRIDAE FAMILY

**ABSTRACT:** Introduction: Arboviruses are transmitted to humans by hematophagous arthropods and have spread to populations in Africa, Asia and the Americas. Several studies have shown that infection by pathogens alters the expression profile of microRNAs. These molecules are transcribed by RNA polymerase II, after transcription, the microRNAs are processed by an RNase III called DROSHA and a DGCR8 double-stranded RNA binding protein; DICER associates with TRBP protein (RNA binding protein responsive to gene activation), with argonaute proteins (AGO1, AGO2, AGO3 or AGO4) in the assembly of the ribonucleoprotein complex. In this study, we evaluated the expression profiles of microRNAs related to the processes of infection by viruses of the family Flaviviridae in human cells. Objective: To elucidate through the literature review the infectious processes involving microRNAs induced by flavivirus in the host. Methods: Articles on the NCBI platform, SciELO, CAPES journals were searched, searching for the following terms: microRNAs, arboviruses, flaviviruses. Results and discussion: It was found that microRNAs are small non-coding sequences that can interfere with the replication of some viruses in post-transcriptional zones, of numerous cell pathways including those associated with pathogenesis. Among the factors we can highlight the regulation of cytokines transforming the growth factor beta (TGF- $\beta$ ), tumor necrosis factor Alpha (TNF- $\alpha$ ), and Gamma interferon (IFN- $\gamma$ ) that are involved in the apoptotic process of infection. One of the events described is that miR-122 inhibits DICER expression and consequently this miR-122 is not produced and viral replication is not processed correctly. Conclusion: We observed that microRNAs are capable of inducing or inhibiting the replication of certain flaviviruses, having the potential to be used in gene therapy procedures, which allows reaching a mechanism capable of preventing the replication of viruses such as Zika, yellow fever, Dengue, collaborating with the quality of people's lives.

**KEYWORDS:** MicroRNAs; ARBOVIRUS; FLAVIVIRUS.

## REFERÊNCIAS

HOLANDA, Gustavo Moraes.; MORAES, Samir Mansour Casseb.; LOPES, Karla Fabiane Melo.; COSTA, Pedro Fernando Vasconcelos.; RIBEIRO, Ana Cecília Cruz. **O vírus da febre amarela modula a expressão das proteínas chaves relacionadas à via microRNA na linhagem de células hepatocarcinoma humanas HepG2.** *Artigo Viral Immunology*, n 5, p 1-2, 2017.

KOZAK, Robert A.; MAJER Ana.; BIONDI, Mia J.; MEDINA, Sarah J; GONEAU, Lee W.; SAJESH, Babu V.; SLOTA, Jessy A.; ZUBACH, Vanessa.; SEVERINI, Alberto.; SAFRONETZ, David.; HIEBERT, Shannon L.; BENIAC, Daniel R.; BOOTH, Timothy F.; KOBINGER, Gary P.; **Desregulação de microRNA em mRNA em astrócitos infectados com o vírus Zika.** Artigo Viruses, p 2-4, 2017.

NASCIMENTO, Rafaela Ferreira; HOLANDA, Gustavo Moraes; SILVA, Eliana Vieira Pinto; MORAES, Samir Mansour Casseb; LOPES, Karla Fabiane Melo; CARVALHO, Carlos Alberto Marques; LIMA, Juliana Abreu; COSTA, Pedro Fernando Vasconcelos; RIBEIRO, Ana Cecília Cruz. **Zika vírus altera o perfil de expressão em genes relacionados a microRNAs em linhagens de células hepáticas, pulmonares e renais.** Artigo Viral Immunology, n 00, p 1-6, 2018.

SALDANA, Miguel A.; ETEBARI, Kayvan.; HART, Charles E.; WOOD, Thomas G.; THANGAMANI, Saravann.; ASGARI, Sassan.; HUGHES, Grant L.; **Zika vírus altera o perfil de expressão de microRNAs e induz resposta de interferência de RNA em mosquitos *Aedes aegypti*.** Artigo Plos Neglected Tropical Disease, p 2-18, 2017.

SMITH, Jessic L.; JENG, Sophia.; MCWEENEY, Shannon K.; HIRSCH, Alec J. **Uma tela de microRNA identifica o WNT sinalizando como rota de um regulador de resposta do interferon durante a infecção Flavivírus.** Journal of Virology, v 91, p 1-2, 2017.

## POTENTIAL PHARMACOLOGICAL APPLICATIONS OF LECTINS

*Data de aceite: 01/07/2020*

*Data de submissão: 30/03/2020*

### **Geovanna Maria de Medeiros Moura**

Federal University of Rio Grande do Norte,  
Department of Biochemistry  
Institute of Tropical Medicine  
Natal, Rio Grande do Norte - Brazil  
<http://lattes.cnpq.br/0915146393491834>

### **Antônio Moreira Marques Neto**

Federal University of Rio Grande do Norte,  
Department of Biochemistry  
Natal, Rio Grande do Norte - Brazil  
<http://lattes.cnpq.br/3751524824523494>

### **Rayana Vanessa da Costa Lima**

Federal University of Rio Grande do Norte,  
Department of Biochemistry  
Institute of Tropical Medicine  
Natal, Rio Grande do Norte - Brazil  
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1537417688700768>

### **Gabriella Silva Campos Carelli**

Federal University of Rio Grande do Norte,  
Department of Biochemistry  
Institute of Tropical Medicine  
Natal, Rio Grande do Norte - Brazil  
<http://lattes.cnpq.br/3384152759391301>

### **Joelton Igor Oliveira da Cruz**

Federal University of Rio Grande do Norte,  
Department of Biochemistry  
Institute of Tropical Medicine  
Natal, Rio Grande do Norte - Brazil  
<http://lattes.cnpq.br/2448189217304566>

### **Luciana Maria Araújo Rabêlo**

Federal Institute of Education, Science and  
Technology of Rio Grande do Norte  
Lajes, Rio Grande do Norte - Brazil  
<http://lattes.cnpq.br/2165223941043909>

### **Anderson Felipe Jácome de França**

Multicampi School of Medical Sciences  
Caicó, Rio Grande do Norte - Brazil  
<http://lattes.cnpq.br/6032490085835412>

### **Bruno Oliveira de Veras**

Federal University of Pernambuco, Department of  
Microbiology  
Recife, Pernambuco - Brazil  
<http://lattes.cnpq.br/7515860243444988>

### **Yago Queiroz dos Santos**

Federal Institute of Education, Science and  
Technology of Ceará  
Boa Viagem, Ceará - Brazil  
Institute of Tropical Medicine  
Natal, Rio Grande do Norte - Brazil  
<http://lattes.cnpq.br/6854116205386919>

**ABSTRACT:** The word lectin is derived from the Latin *legere* which means “to choose” or “to select” and was introduced in biochemistry in the second half of the 20th century. Such molecules are characterized as glycoproteins that generally do not have an enzymatic role while have at least one non-catalytic domain – lectins are reversibly and specifically associated with simple and complex carbohydrates. Lectins differ from all other proteins through this type of connection with carbohydrates, promoting the ability to agglutinate cells through interaction with specific glycidic segments having a non-immune origin. The present work aims to review the specialized literature in order to list the potential pharmacological applications derived from lectin-carbohydrate specificity in its most varied approaches.

**KEYWORDS:** Protein, Lectin, Biological activities.

## POTENCIAIS APLICAÇÕES FARMACOLÓGICAS DAS LECTINAS

**RESUMO:** A palavra lectina é derivada do latim *legere* que significa “para escolher” ou “selecionar” e foi introduzida na bioquímica na segunda metade do século XX. Tais moléculas são caracterizadas como glicoproteínas que geralmente não possuem papel enzimático e apresentam ao menos um domínio não-catalítico – as lectinas se associam de forma reversível e específica aos carboidratos simples e complexos. As lectinas diferem de todas as outras proteínas através desse tipo de ligação com carboidratos promovendo a habilidade de aglutinar células por meio da interação com glicídeos específicos apresentando uma origem não-imune. O presente trabalho tem por objetivo revisar a literatura especializada de maneira a elencar as potenciais aplicações farmacológicas decorridas da especificidade lectina-carboidrato em suas mais variadas abordagens.

**PALAVRAS-CHAVE:** Proteína, Lectina, Atividades Biológicas.

### 1 | INTRODUCTION

Lectins are characterized as proteins and / or glycoproteins that do not have an enzymatic role - except for chimerlectins - and have at least one non-catalytic domain, lectins are reversibly and specifically associated with simple and complex carbohydrates (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; SANTOS SILVA *et al.*, 2019). The presence of a region known as carbohydrate recognizing domain (CRD) - conserved in different types of lectins - allows lectins to interact with specific glycidic segments (NI; TIZARD, 1996; VAN HOLLE *et al.*, 2017).

This interaction occurs through hydrogen bonds as well as Van der Waals forces between the glycidic segments (carbohydrates) and the amino acid residues present in the lectin's CRD. (HAMID *et al.*, 2013; LIS; SHARON, 1998). Lectins differ from all other proteins because of its type of carbohydrate binding which promotes the ability to agglutinate cells through interaction with specific carbohydrates while maintaining nonimmune origin (DE MEJÍA; PRISECARU, 2005; GOLDSTEIN *et al.*, 1980).

The cell agglutination process occurs through the interaction of lectins with the glycoconjugates present in the cell membrane, thus lectins promote cross-links between adjacent cells, agglutinating them (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). When the agglutination process occurs through the binding of lectins to carbohydrates on the surface of red blood cells, it can be observed macroscopically in a process named as hemagglutination (ALONSO *et al.*, 2001). At the end of the 19th century, microbiologist Peter Hermann Stillmark obtained the first evidence about the nature of proteins that agglutinates erythrocytes, called hemagglutinins (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011; SHARON; LIS, 2004). In 1888, Stillmark detected the presence of lectins by assessing the toxicity of protein extracts from seeds (*Ricinus communis*), the first hemagglutinin depicted was called ricin (STILLMARK, 1888).

The hemagglutination phenomenon occurs due to the presence of glycoconjugates present on the outer N-terminal region of the largest transmembrane sialoglycoprotein of erythrocytes, Glycophorin A (GPA). Representing 2 to 4% of the erythrocyte membrane proteins, GPA is biochemically constituted by sialic acid and terminal carbohydrates, because of its high concentration in the erythrocyte membrane GPA alone is responsible for 80% of the negative charge of these cells (AUFFRAY *et al.*, 2001). The importance of the negatively charged surface in the case of erythrocytes is the lower occurrence of cell-cell interaction and, in turn, erythrocyte agglutination, events that would hinder blood circulation. Glycophorin A is part of the class of glycoporphins that have three domains: an external domain to the membrane presenting oligosaccharides in its structure, a domain in the membrane bilayer and another in the internal portion in the cell cytoplasm. GPA differs from the others because its external domain is susceptible to modifications by enzymes such as trypsin, ficin and papain (MURADOR; DEFFUNE, 2007).

It was possible to improve the hemagglutination assays with lectins, because with commercially available proteases, trypsin and papain, for example, it is possible to modify the erythrocyte cell membrane in different parameters due to the action of these enzymes on the “scenario” of the surface of the membrane, allowing the interaction of lectins with their respective carbohydrates to be facilitated. The increase in agglutination in blood treated with proteases occurs due to the decrease in the net negative charge on the surface of erythrocytes and also through the cleavage of peptides and glycoproteins which, without the action of enzymes, can hinder the access of lectins by steric impediment, hindering hemagglutination (MURADOR; DEFFUNE, 2007; SCHNEBLI; ROEDER, 1976).

The hemagglutination experiment is a semi-quantitative experiment carried out using a bottom “V” or “U” microplate in which the serial dilution of the sample is made in which a possible lectin or the already isolated lectin is sought in which one wishes to observe the hemagglutinating activity. The dilution is done using 0.9% saline and after application of the sample, the addition of enzyme-treated and/or non-enzyme-treated red cells is added at a concentration of 2-4%. After 30 minutes at room temperature the results are interpreted by hemagglutination units (UH) which is the inverse of the last dilution in which

the hemagglutination phenomenon was observed(FERREIRA *et al.*, 2018; MOREIRA; PERRONE, 1977).

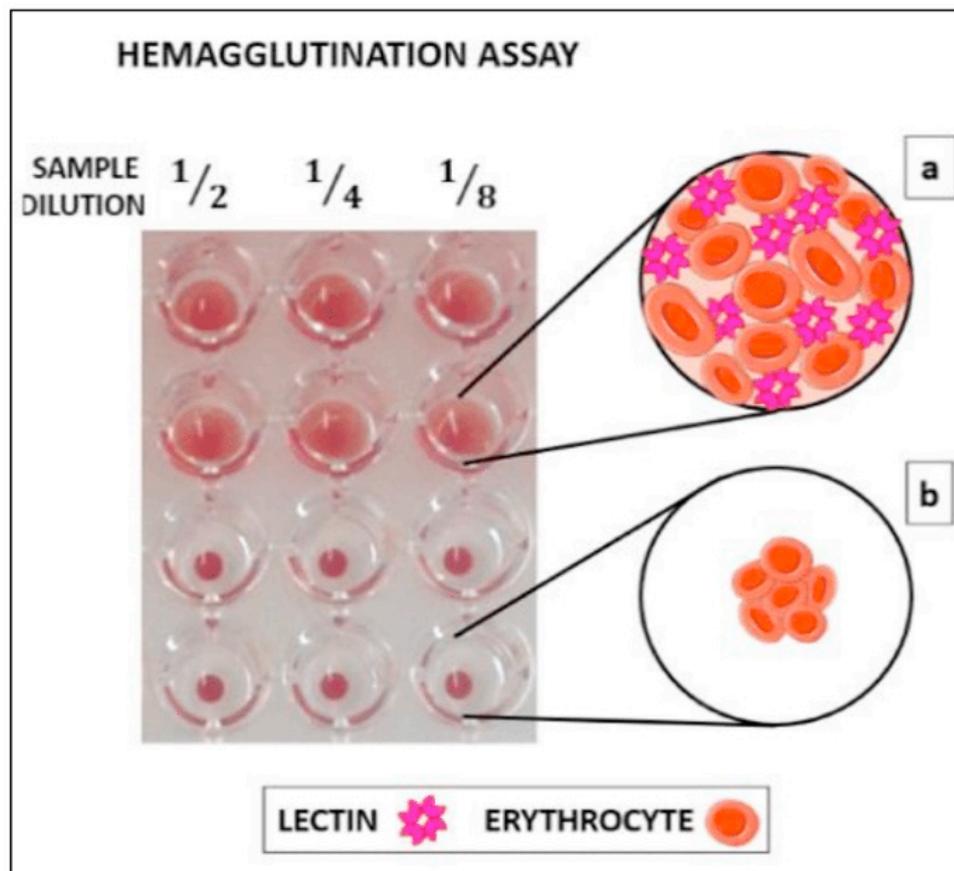


FIGURE 1. Hemagglutination test for the detection of lectins in "V" bottom microplates. (a) Formation of the erythrocyte network due to the presence of lectins; (b) Absence of hemagglutinating activity sedimentation of erythrocytes at the bottom of the well.

It can be observed an example with a real and fictitious image of how hemagglutination by lectins occurs in which the network of erythrocytes is formed(Figure 1), intertwined by the cross-linking of lectins with more than one CRD. This network of erythrocytes is possible to observe with the naked eye and allows the interpretation of results, when there is no presence of lectins in the tested samples, there is no formation of the erythrocyte network and these end up sinking at the bottom of the well, hence the importance of bottom microplates "V" or "U". If we were to analyze the sample in figure 1 assuming that the hemagglutination was up to a 1/8 dilution, we will have a hemagglutin unit equal to 8 (UH = 8).

The modernization of the hemagglutination method to study lectin activity uses radioactive marking, increasing the sensitivity and precision of the experiment(HENDRICKSON; ZHERDEV, 2018). The use of the conventional hemagglutination experiment is widely explored in monitoring the purification steps and studying the most diverse sources, such as lectins, mainly from plants(BHUTIA *et al.*, 2019; DIAS *et al.*, 2015), sponges(GARDÈRES *et al.*, 2015), algae(SINGH; WALIA,

2018), fungi(KOBAYASHI; KAWAGISHI, 2016), bacteria(KUMAR; MITTAL, 2012)fish and crustaceans (JAYANTHI *et al.*, 2017; LIU, XIAOBING *et al.*, 2019), insects(VELAYUTHAM *et al.*, 2017), snakes(KLEIN *et al.*, 2015; NUNES *et al.*, 2011), humans(MUKHERJEE *et al.*, 2014).

Explaining their global structures related to their carbohydrate binding domain, according to Peumans & Van Damme (1995): Merolectins, lectins that have a single carbohydrate binding site, not being able to promote erythrocyte agglutination and neither precipitation glycoconjugates, an example of merolectins are those of the species *Hevea brasiliensis*, obtained from the latex of the rubber tree; Hololectins, are those that have at least two carbohydrate binding sites, agglutinate cells and precipitate glycoconjugates, encompassing a large part of the lectins from plants such as *Canavalia ensiformis*; Chimerolectins, have one or more binding sites with carbohydrates and another site with biological or catalytic activity, which can act -depending on their sites -as hololectins or merolectins. An example of chimerolectin is the species *Ricinus communis*, which inhibits ribosome activity; Superlectins, have at least two binding sites and each one can bind to different carbohydrates, an example is the lectin present in the bulb of *Tulipa gesnerianawhich* has a specific site for mannose and another for N-acetylgalactosamine.

## 2 | LECTINS AND ITS BIOLOGICAL ACTIVITIES

In addition to agglutination, the interaction between carbohydrates and lectins can play a key role in controlling normal and pathological processes in numerous organisms acting on many cell reactions such as cell growth, cell adhesion and cell division(FRANCISCO, 1991; ODINTSOVA *et al.*, 2001; TANIDA *et al.*, 2013). Just as this connection can act by inducing many different biological processes such as: characterization of ABO blood groups(MATSUI *et al.*, 2001); bacterial agglutination (KHIN *et al.*, 2000); lymphocytestransformation(KILPATRICK; GRAHAM; URBANIAK, 1986); inflammation (WALSH *et al.*, 2005); apoptosisand protein regulation (PONRAJ *et al.*, 2016); cytotoxicity(CHATTERJEE *et al.*, 2016)tumorsand metastases(GORELIK; GALILI; RAZ, 2001); interaction between pathogensand itshosts(MEERT *et al.*, 2014; SINGH; WALIA; KANWAR, 2016).

Recentstudiesamongcountless of which report the participation of lectins inintracellular and extracellular processes that also have potential as therapeutic applications.(BISWAS, 2014).The biotechnological applications of lectins mainly involve their specific and high capacity to recognize carbohydrates, being targets as promising tools for biorecognition technology such as microarray techniques that use lectins to decipher biochemical “codes”that reflect the cell's physiological state(GEMEINER *et al.*, 2009; YU; SHU; LI, 2020). Also used as isolation tools and in the mapping of cell surface glycoconjugates(XIE

*et al.*, 2009). As well as affinity chromatography experiments with immobilization of lectins in the fixed matrix, as in the case of *Canavalia ensiformis* seed lectin that was efficient in separating glycoproteins from human serum(QIU; ZHANG; REGNIER, 2007).

Biorecognition through lectins can be used as a histochemical marker for the analysis of normal or altered human tissues(CAMPOS *et al.*, 2006). Another example of a cell in which lectins can be used -through biorecognition, toxic action, inhibition and / or agglutination -is the intracellular parasite *Leishmania amazonenses* that has glycoconjugates on its cell surface with the function of recognition by the host cell as well as in the virulence of the parasite(ARANDA-SOUZA *et al.*, 2018; JECNA *et al.*, 2013).Lectins are also involved in differentiating between malignant and benign tumors and the degree of glycosylation associated with metastasis(LIU, BO; BIAN; BAO, 2010).

### 3 | ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF LECTINS

The ability of lectins to interact with carbohydrates present on the surface of bacteria can prevent their mobility and growth, this interaction can change the structure of the bacteria and the permeability of its membrane(GAIDAMASH; STADEN, 2002). This characteristic can act in the identification of bacterial species through the difference of agglutination in microtiter plates, as in the experiment in which 23 lectin types were used and it was demonstrated that the lectin-bacterium interaction can be used as a possible tool to identify the species of *Mycobacterium*(ATHAMNA *et al.*, 2006).

The lectin isolated from *Aplysia* sp. which is able to agglutinate *Escherichia coli* indicating its presence(GILBOA-GARBER; SUDAKEVITZ, 2001). The interaction of lectins and bacteria is based on the carbohydrates of cellular appearance and extracellular glycans, since bacteria expose carbohydrates on their surface, the carbohydrate-binding region plays a very important role for the interaction of bacteria and lectins(SINGH; KAUR; SINGH, 2014).

Research works highlighting lectins as potential bacterial anti-biofilm tools are also found as: the antibiofilm activity of Bangladeshi potato lectin *Pseudomonas aeruginosa*(HASAN; OZEKI; KABIR, 2014); inhibition of the biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* by the lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom (KLEIN; FABRES-KLEIN; OLIVEIRA, 2015); and reduction of the biofilm formation of *S. aureus* and *Escherichia coli* by lectin from the marine sponge *Aplysina lactuca* (CARNEIRO *et al.*, 2017).

Because they are proteins of non-immune origin capable of reversibly binding to carbohydrates, lectins can interact with the cell wall of bacteria and their extracellular glycans, often acting as an antibacterial molecule. (SINGH; BHARI; KAUR, 2010). Changes in cell permeability, due to the ability to form pores in the membrane, is the most explored

antibacterial mechanism of lectins (ARASU et al., 2017). Examples of this activity are found in the lectin of the mushroom *Sparassis latifolia* which was toxic against *E. coli*, a resistant strain of *S. aureus* and *P. aeruginosa* (CHANDRASEKARAN et al., 2016). The lectin found in the hemolymph of the crab *Portunus pelagicus* acted as an antibacterial agent against other species such as *Bacillus thuringiensis*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter murlinae*, among others (JAYANTHI et al., 2017).

#### 4 | LECTINS AND CANCER

In this last century, a large number of researchers have looked at the identification of new lectins, also studying their biomedical potential and their more intrinsic chemical characteristics, studies have sought to show that lectins, due to their potential to interact with cell membrane carbohydrates, could, also interfere in cellular communication networks, which are responsible for regulating various processes (PINHO; REIS, 2015).

Of all the human pathologies already described, cancer is one of the most difficult to decipher, since mutations that happen in a disordered way alter various aspects of cells, such as, for example, the glycosylation of several cellular proteins, being membrane proteins (WANG; AO; VUONG, 2011) and proteins secreted by cells, considered a priority in the study of these interactions (HAUTALA et al., 2020).

Regarding the inhibition of cell proliferation, some lectins inhibit the proliferation of malignant cells through binding with the surface glycoconjugates, without necessarily being internalized (FERRIZ-MARTINEZ et al., 2010). The ability to prevent the proliferation of tumor cells was found in several lectins, such as in the lectin extracted from latex of the plant species *Euphorbia tirucalli*, which proved effective against HeLa (human adenocarcinoma) cell lines, PC3 (Prostate cancer), MDA-MB-231 and MCF-7 (breast cancer) (PALHARINI et al., 2017), also in the lactose-binding lectin of the marine sponge *Cinachyrella apion*, which acted in the cell death of the human adenocarcinoma lineage (HeLa) (RABELO et al., 2012) and lectin obtained in the fruiting bodies of the fungus *Clitocybe nebularis* (SABOTIČ; KOS, 2019) the latter was responsible for cytotoxic activity against leukemic T cells.

In addition to the interactions between lectins and cells that alter cell viability, lectins have recently been the subject of studies involving the detection of biomarkers, in the specific case of markers of the presence or stage of tumor cells (HASHIM; JAYAPALAN; LEE, 2017), this research is very relevant because many types of cancer have a very difficult early diagnosis, which can reduce the chances of patients controlling the disease at the right time and avoiding the process of metastasis (AL-AZRI, 2016).

## 5 | CONCLUSIONS

After all the approaches described above we can conclude that lectins have great potential in research both against some types of cancer, microbial infections and even biotechnological applications as shown in figure 2.

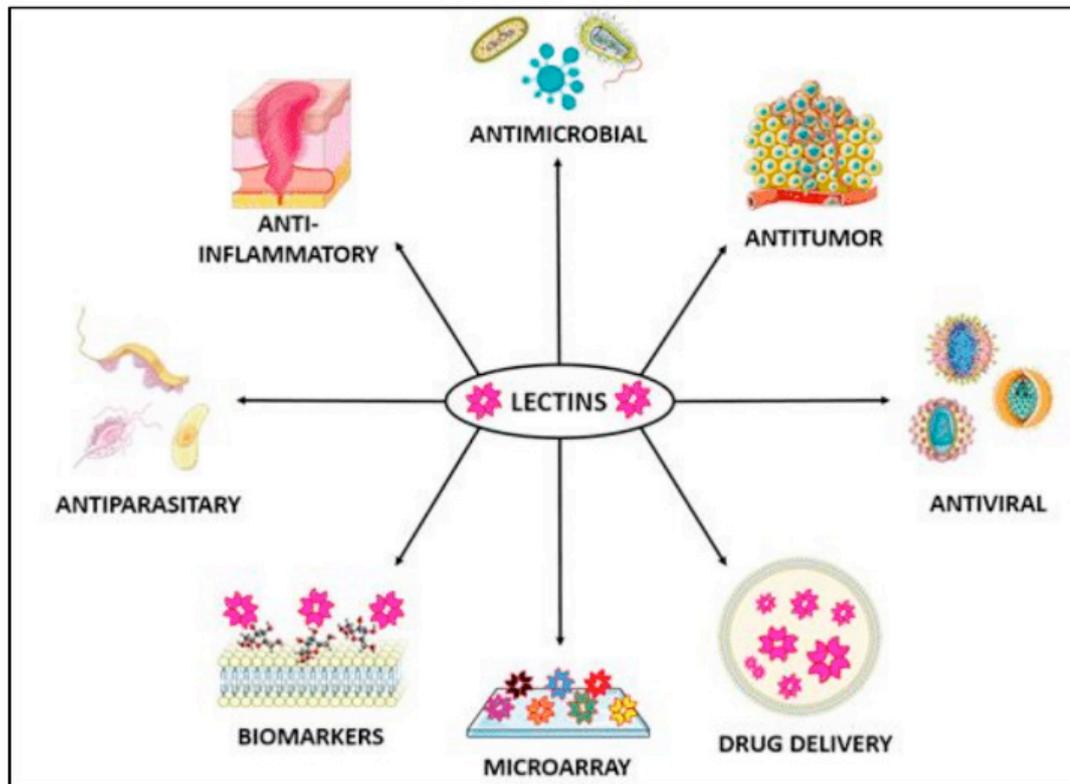


FIGURE 2. Lectins and their most diverse applications in science and biotechnology.

In addition to being widely distributed in the most different organisms, the analysis of its activity thanks to the hemagglutination technique that allows visualizing the action of its binding site and specificity, allowing researchers of this biomolecule to follow the stages of purification and later biological applicability of lectin. pure. Its application in treatments, diagnostics, identification and even addressing biomolecules has a long way to be explored in scientific research.

## REFERENCES

AL-AZRI, Mohammed H. **Delay in cancer diagnosis: Causes and possible solutions.** *Oman Medical Journal*, v. 31, n. 5, p. 325–326, 2016.

ALONSO, R. *et al.* **The effect of extrusion cooking on mineral bioavailability in pea and kidney bean seed meals.** *Animal Feed Science and Technology*, v. 94, n. 1–2, p. 1–13, 2001.

ARANDA-SOUZA, Mary Ângela *et al.* **In vitro effect of Bothrops leucurus lectin ( BLL ) against Leishmania amazonensis and Leishmania braziliensis infection.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 120, p. 431–439, 2018.

ATHAMNA, Abed *et al.* **Rapid identification of Mycobacterium species by lectin agglutination.** *Journal of Microbiological Methods*, v. 65, p. 209–215, 2006.

AUFFRAY, Isabelle *et al.* **Glycophorin A dimerization and band 3 interaction during erythroid membrane biogenesis: In vivo studies in human glycophorin A transgenic mice.** *Blood*, v. 97, n. 9, p. 2872–2878, 2001.

BHUTIA, Sujit K. *et al.* **Plant lectins in cancer therapeutics: Targeting apoptosis and autophagy-dependent cell death.** *Pharmacological Research*, v. 144, n. January, p. 8–18, 2019.

BISWAS, Gopa Roy. **Exploring plant lectins in diagnosis, prophylaxis and therapy.** *Journal Of Medicinal Plant Research*, n. December 2013, 2014.

CAMPOS, L M *et al.* **Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. Biomarkers: biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals**, v. 11, n. 5, p. 480–4, 2006.

CHATTERJEE, Biji *et al.* **A novel L-fucose-binding lectin from Fenneropenaeus indicus induced cytotoxicity in breast cancer cells.** *Journal of Biochemistry Advance Access published October 9, 2009*, v. 161, n. 1, p. 87–97, 2016.

DE MEJÍA, Elvira González; PRISECARU, Valentin I. **Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment.** *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 45, n. 6, p. 425–45, 2005.

DIAS, Renata De Oliveira *et al.* **Insights into Animal and Plant Lectins with Antimicrobial Activities.** *Molecules*, p. 519–541, 2015.

FERREIRA, Gustavo Ramos Salles *et al.* **Antimicrobial potential of Alpinia purpurata lectin (ApuL): Growth inhibitory action, synergistic effects in combination with antibiotics, and antibiofilm activity.** *Microbial Pathogenesis*, v. 124, n. July, p. 152–162, 2018.

FRANCISCO, South San. **Lectin Cell Adhesion Molecules ( LEC-CAMs ): A New Family of Cell Adhesion Proteins Involved With Inflammation.** *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 146, n. 1 991, p. 139–146, 1991.

GAIDAMASH, M; STADEN, J. **Interaction of lectin-like proteins of South African medicinal plants with Staphylococcus aureus and Bacillus subtilis.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 80, p. 131–135, 2002.

GARDÈRES, Johan *et al.* **Porifera lectins: Diversity, physiological roles and biotechnological potential.** *Marine Drugs*, v. 13, n. 8, p. 5059–5101, 2015.

GEMEINER, Peter *et al.* **Lectinomics. II. A highway to biomedical/clinical diagnostics.** *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 1, p. 1–15, 2009.

GHAZARIAN, Haike; IDONI, Brian; OPPENHEIMER, Steven B. **A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics.** *Acta Histochemica*, v. 113, n. 3, p. 236–247, 2011.

GILBOA-GARBER, Nechama; SUDAKEVITZ, Dvora. **Usage of Aplysia lectin interactions with T antigen and poly- N -acetylactosamine for screening of E . coli strains which bear glycoforms cross-reacting with cancer-associated antigens.** *Immunology and Medical Microbiology*, v. 30, p. 235–240, 2001.

GOLDSTEIN, Irwin J *et al.* **What should be called a lectin?** *Nature*. [S.l.: s.n.]. , 1980

GORELIK, Elieser; GALILI, Uri; RAZ, Avraham. **On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis.** *Cancer and Metastasis Reviews*, v. 20, n. 3–4, p. 245–277, 2001.

HAMID, Rabia *et al.* **Lectins: Proteins with Diverse Applications.** *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 3, 2013.

HASHIM, Onn Haji; JAYAPALAN, Jaime Jacqueline; LEE, Cheng Siang. **Lectins: An effective tool for screening of potential cancer biomarkers.** *PeerJ*, v. 2017, n. 9, p. 1–30, 2017.

HAUTALA, Laura C *et al.* **Altered glycosylation of glycodelin in endometrial carcinoma.** *Laboratory Investigation*, p. 3–8, 2020.

HENDRICKSON, O. D.; ZHERDEV, A. V. **Analytical Application of Lectins.** *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v. 48, n. 4, p. 279–292, 2018.

JAYANTHI, Sangily *et al.* **Purification, characterization and functional analysis of the immune molecule lectin from the haemolymph of blue swimmer crab *Portunus pelagicus* and their antibiofilm properties.** *Fish and Shellfish Immunology*, v. 62, p. 227–237, 2017.

JECNA, Lucie *et al.* **The role of surface glycoconjugates in *Leishmania* midgut attachment examined by competitive binding assays and experimental development in sand flies.** *Parasitology*, v. 140, p. 1026–1032, 2013.

KHIN, Mar Mar *et al.* **Agglutination of *Helicobacter pylori* coccoids by lectins.** *World Journal of Gastroenterology*, v. 6, n. 2, p. 202–209, 2000.

KILPATRICK, D C; GRAHAM, C; URBANIAK, S J. **Inhibition of human lymphocyte transformation by tomato lectin.** *Scand J Immunol*, v. 24, n. 1, p. 11–19, 1986.

KLEIN, Raphael Contelli *et al.* **A C-type lectin from *Bothrops jararacussu* venom disrupts staphylococcal biofilms.** *PLoS ONE*, v. 10, n. 3, p. 1–16, 2015.

KOBAYASHI, Yuka; KAWAGISHI, Hirokazu. **Fungal Lectins: A Growing Family.** *Lectins: Methods and Protocol*. 2016. v. 1200. p. 15–38.

KUMAR, Dharmendra; MITTAL, Yashoda. **Bacterial Lectin Db: An integrated bacterial lectin database.** *Bioinformatics*, v. 8, n. 6, p. 281–283, 2012.

LIS, Halina; SHARON, Nathan. **Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition.** *Chemical Reviews (Washington, DC, United States)*, v. 98, n. 2, p. 637–674, 1998.

LIU, Bo; BIAN, He jiao; BAO, Jin ku. **Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic.** *Cancer Letters*, v. 287, n. 1, p. 1–12, 2010.

LIU, Xiaobing *et al.* **A novel C-type lectin from spotted knifejaw, *Oplegnathus punctatus* possesses antibacterial and anti-inflammatory activity.** *Fish and Shellfish Immunology*, v. 92, n. March, p. 11–20, 2019.

MATSUI, Tai *et al.* **Comparative study of blood group-recognizing lectins toward ABO blood group antigens on neoglycoproteins, glycoproteins and complex-type oligosaccharides.** *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, v. 1525, n. 1–2, p. 50–57, 2001.

MEERT, Paulien *et al.* **Development and application of a novel recombinant *Aleuria aurantia* lectin with enhanced core fucose binding for identification of glycoprotein biomarkers of hepatocellular carcinoma.** *Proteomics*, p. 1–26, 2014.

MOREIRA, R. a.; PERRONE, J. C. **Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*.** *Plant Physiology*, v. 59, p. 783–7, 1977.

- MUKHERJEE, S *et al.* **Antibacterial membrane attack by a pore-forming intestinal C-type lectin.** *Nature*, v. 505, n. 7481, p. 103–107, 2014.
- MURADOR, Priscila; DEFFUNE, Elenice. **Aspectos estruturais da membrana eritrocitária.** *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 29, n. 2, p. 168–178, 2007.
- NI, Y.; TIZARD, I. **Lectin-carbohydrate interaction in the immune system.** *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 55, n. 1–3, p. 205–223, 1996.
- NUNES, Erika dos Santos *et al.* **Purification of a lectin with antibacterial activity from Bothrops leucurus snake venom.** *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, v. 159, n. 1, p. 57–63, 2011.
- ODINTSOVA, Nelly A *et al.* **Effect of lectin from the ascidian on the growth and the adhesion of HeLa cells.** *Molecular and Cellular Biochemistry*, p. 133–138, 2001.
- PALHARINI, Julio G. *et al.* **Eutirucallin: A Lectin with Antitumor and Antimicrobial Properties.** *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 7, n. April, p. 1–13, 2017.
- PEUMANS, W J; VAN DAMME, E J. **Lectins as plant defense proteins.** *Plant physiology*, v. 109, n. 2, p. 347–352, 1995.
- PINHO, Salomé S; REIS, Celso A. **Glycosylation in cancer : mechanisms and clinical implications.** *Nature Publishing Group*, v. 16, n. August, 2015.
- PONRAJ, Thondhi *et al.* **Protein regulation and Apoptotic induction in human breast carcinoma cells (MCF-7) through lectin from G. beaults.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 95, p. 1235–1245, 2016.
- QIU, Ruiqing; ZHANG, Xiang; REGNIER, Fred E. **A method for the identification of glycoproteins from human serum by a combination of lectin affinity chromatography along with anion exchange and Cu-IMAC selection of tryptic peptides.** *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 845, n. 1, p. 143–150, 2007.
- RABELO, Luciana *et al.* **A Lactose-Binding Lectin from the Marine Sponge Cinachyrella Apion (Cal) Induces Cell Death in Human Cervical Adenocarcinoma Cells.** *Marine Drugs*, v. 50, p. 727–743, 2012.
- SABOTIČ, Jerica; KOS, Janko. **CNL–Clitocybe nebularis Lectin—The Fungal GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc-Binding Lectin.** *molecules*, n. Table 1, p. 1–10, 2019.
- SANTOS SILVA, Priscila Marcelino *et al.* **Insights into anti-pathogenic activities of mannose lectins.** *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019.
- SCHNEBLI, H P; ROEDER, C. **Surface Charge Density and Agglutination III ilm.** *Experimental Cell Research* 98, v. 98, p. 273–276, 1976.
- SHARON, Nathan; LIS, Halina. **History of lectins: From hemagglutinins to biological recognition molecules.** *Glycobiology*, v. 14, n. 11, p. 53–62, 2004.
- SINGH, Ram Sarup; KAUR, Hemant Preet; SINGH, Jatinder. **Purification and Characterization of a Mucin Specific Mycelial Lectin from Aspergillus gorakhpurensis : Application for Mitogenic and Antimicrobial Activity.** *PLoS ONE*, v. 9, n. 10, 2014.
- SINGH, Ram Sarup; WALIA, Amandeep Kaur. **Lectins from red algae and their biomedical potential.** *Journal of Applied Phycology*, v. 30, n. 3, p. 1833–1858, 2018.

SINGH, Ram Sarup; WALIA, Amandeep Kaur; KANWAR, Jagat Rakesh. **Protozoa lectins and their role in host-pathogen interactions.** *Biotechnology Advances*, v. 34, n. 5, p. 1018–1029, 2016.

TANIDA, Shuhei *et al.* **Binding of the sialic acid-binding lectin, siglec-9, to the membrane mucin, MUC1, induces recruitment of  $\beta$ -catenin and subsequent cell growth.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 288, n. 44, p. 31842–31852, 2013.

VAN HOLLE, Sofie *et al.* **Comparative study of lectin domains in model species: New insights into evolutionary dynamics.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 6, 2017.

VELAYUTHAM, Veeramani *et al.* **Purification, characterization, and analysis of antibacterial activity of a serum lectin from the grub of rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros*.** *Process Biochemistry*, v. 53, p. 232–244, 2017.

WALSH, Mary C *et al.* **Mannose-Binding Lectin Is a Regulator of Inflammation That Accompanies Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury.** *The Journal of Immunology*, v. 175, n. 1, p. 541–546, 2005.

WANG, Yanfei; AO, Xiaoping; VUONG, Huy. **Membrane Glycoproteins Associated with Breast Tumor Cell Progression Identified by a Lectin Affinity Approach.** *Wang, Yanfei Ao, Xiaoping Konanur, Meghana*, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2011.

XIE, Min *et al.* **Lectin-modified trifunctional nanobiosensors for mapping cell surface glycoconjugates.** *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24, n. 5, p. 1311–1317, 2009.

YU, Hanjie; SHU, Jian; LI, Zheng. **Lectin microarrays for glycoproteomics: an overview of their use and potential.** *Expert Review of Proteomics*, v. 17, n. 1, p. 27–39, 2020.

## PRODUÇÃO DE UM CONSÓRCIO ENZIMÁTICO VISANDO OBTENÇÃO DE ETANOL 2G A PARTIR DO BAGAÇO DE CANA

Data de aceite: 01/07/2020

Data de submissão: 03/04/2020

### Ignácio Martins Pinho

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de  
Ribeirão Preto, USP-RP, Departamento de  
Biologia

Ribeirão Preto - SP

<http://lattes.cnpq.br/4709196539100068>

### Ana Sílvia de Almeida Scarcella

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP-  
RP, Departamento de Bioquímica e Imunologia

Ribeirão Preto - SP

<http://lattes.cnpq.br/1995775844571462>

### Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de  
Ribeirão Preto, USP-RP, Departamento de  
Biologia

Ribeirão Preto - SP

<http://lattes.cnpq.br/0162059400153020>

**RESUMO:** Com a crescente busca por fontes alternativas de energia, o bagaço da cana, por ser um resíduo agroindustrial rico em celulose e hemicelulose, é apontado como uma fonte potencial para produção de bioetanol. Entretanto, a produção a níveis industriais de etanol de segunda geração ainda não é economicamente

viável devido ao alto custo do processo. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo um aumento da eficiência de uma das etapas deste processo: a sacarificação do bagaço da cana realizada por enzimas originárias dos fungos filamentosos *Trichoderma reesei* RP98 e *Mycothermus thermophilus*. Foram analisadas a capacidade destes fungos de produzir as enzimas endoglucanase, xilanase, celobiohidrolase,  $\beta$ -glucosidase e pectinase a partir de dois substratos diferentes, sabugo e palha de milho. Para cada enzima produzida, foi feita a caracterização de temperatura e pH ótimos. Os dois fungos apresentaram resultados promissores, com destaque para a produção de enzimas por *Trichoderma reesei* em sabugo de milho e para a produção de enzima por *Mycothermus thermophilus* em palha de milho. Entretanto, a produção de enzimas ainda pode ser melhorada e estudada em função de outros fatores. O projeto foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto sob orientação da Profa. Dra. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli e co-orientação da doutoranda Ana Sílvia de Almeida Scarcella.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Trichoderma reesei* RP98, *Mycothermus thermophilus*, Coquetel Enzimático, Biomassa Lignocelulósica e Caracterização.

## PRODUCTION OF A ENZYMATIC CONSORTIUM AIMING 2G ETHANOL OBTAINMENT FROM SUGARCANE BAGASSE

**ABSTRACT:** With the emerging search for alternative sources of energy, sugarcane bagasse, for being an agroindustrial residue rich in cellulose and hemicellulose, is pointed as a potential source for bioethanol production. However, second generation ethanol production at industrial levels is yet to become economically viable due to the high cost of the process. In this context, this work aimed to increase the efficiency of one of the steps in this process: the saccharification of sugarcane bagasse performed by enzymes originated from the filamentous fungi *Trichoderma reesei* RP98 and *Mycothermus thermophilus*. The capabilities of this fungi to produce the enzymes endoglucanase, xylanase, cellobiohydrolase,  $\beta$ -glucosidase and pectinase using two different kinds of substrate, corn cob and corn straw, were analyzed. For each enzyme produced, the optimal temperature and pH were characterized. Both fungi presented promising results, highlighting the enzyme production from *Trichoderma reesei* cultivated in corn cob and the enzyme production from *Mycothermus thermophilus* cultivated in cron straw. Nonetheless, it is possible to increase and study furthermore the enzyme production considering other factors.

**KEYWORDS:** *Trichoderma reesei* RP98, *Mycothermus thermophilus*, Enzymatic Cocktail, Lignocellulosic Biomass and Characterization.

### 1 | INTRODUÇÃO

O predomínio de combustíveis fósseis na matriz energética mundial desde o início da era moderna é tido como responsável pelo aumento na concentração de CO<sub>2</sub> na atmosfera e, conseqüentemente, pelas mudanças climáticas ao redor do globo. Neste cenário, fontes de energia renováveis são vistas como alternativa aos derivados do petróleo. O bioetanol brasileiro produzido a partir da cana-de-açúcar é uma das opções consideradas viáveis, embora ainda não tenha atingido seu potencial máximo. Os abundantes resíduos lignocelulósicos, como o bagaço da cana-de-açúcar, são possíveis fontes para a produção de bioetanol e sua conversão em biocombustíveis tornaria a produção mais eficiente (SOCCOL et al., 2010; GRAY; ZHAO; EMPTAGE, 2006; SHIELDS; BOOPATHY, 2011).

O cultivo de cana-de-açúcar e a produção açucareira acompanham o desenvolvimento da história do Brasil desde meados do século XVI, representando, por muito tempo, o produto mais importante para a economia brasileira. Com a transição para uma economia mais complexa e diversificada, e também em função de situações do mercado internacional, a cana-de-açúcar perdeu espaço para outros produtos (FURTADO, 2005). Em 1973, a crise do petróleo fez surgir um interesse no desenvolvimento e produção de fontes alternativas de energia ao redor do globo. O governo brasileiro, então, lançou em 1975 um programa chamado ProÁlcool, que visava aumentar a produção de etanol através de

diversos incentivos e subsídios. Nesta época o etanol era adicionado à gasolina em uma proporção de até 22%. Foi somente a partir de 1980 que foram desenvolvidos motores para automóveis que funcionavam inteiramente a base de etanol e por volta de 1991 já havia, aproximadamente, 3,5 milhões de automóveis movidos à álcool no Brasil, enquanto, na mesma época, havia por volta de 4,5 milhões de automóveis movidos à gasolina misturada com etanol (NITSCH, 1991). No cenário atual, o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar no mundo e o segundo maior produtor de bioetanol, somente atrás dos Estados Unidos (SALES-FILHO et al., 2017), cultivando 620 milhões de toneladas de cana-de-açúcar na safra de 2018/2019 numa área de aproximadamente 10,2 milhões de hectares (2017), sendo 53.7% da produção vinda do Estado de São Paulo e 92.3% da Região Centro-Sul. No mesmo período a produção de etanol no Brasil atingiu 33 milhões de m<sup>3</sup>, sendo 93.5% deste total produzido da Região Centro-Sul (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2019; UNICA, 2019).

### 1.1 Variedade de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma gramínea do gênero *Saccharum* originária do sul e sudeste asiático que é utilizada e cultivada há milênios em regiões como a Índia e a China. As variedades de cana utilizadas comercialmente na atualidade são originárias de seleções, cruzamentos entre diversas espécies de *Saccharum* e de vários melhoramentos genéticos. Inicialmente foram cruzados indivíduos das espécies *S. officinarum*, já utilizada para cultivo, e a espécie selvagem *S. spontaneum*, com o objetivo de se conseguir uma planta que fosse resistente e com alta produção de açúcar. Essas variantes foram, em seguida, cruzadas entre si, o que levou a uma base genética relativamente pequena. Para resolver este problema, foram realizados diversos cruzamentos entre estas plantas com espécies selvagens como *S. edule*, *S. barberi*, *S. sinense*, *S. robustum*, *S. officinarum* e *S. spontaneum*, com as duas últimas ainda sendo mais dominantes, em especial a *S. officinarum*. As diversas variedades de cana-de-açúcar cultivadas atualmente são, portanto, chamadas de *Saccharum spp.* Estes cruzamentos e melhoramentos objetivavam maior produção de açúcar (OKUNO, 2016).

No contexto atual da produção de etanol surgiu a “cana energia”, oriunda de cruzamentos entre variedades comerciais e *S. spontaneum*. Esta nova variedade vai na contramão das outras variedades de cana cultivadas para fins alimentícios e tem potencial para dar um novo impulso à produção de biocombustíveis no Brasil. A cana energia produz uma quantidade maior de biomassa em detrimento da produção de açúcar. Produzindo cerca de 30% menos sacarose, ocorre um aumento de 100% na quantidade total de biomassa, resultando em um incremento significativo de eficiência na produção de etanol por hectare. Além disso, a cana energia é uma planta mais resistente do que as outras variedades, podendo ser cultivada em locais anteriormente inviáveis para a cultura (OKUNO, 2016; MATSUOKA et al., 2016).

## 1.2 Produção de etanol 1g

Para se produzir etanol a partir da cana-de-açúcar, a cana deve passar pela moagem. Após a trituração, será extraído um caldo que representa 70% do volume inicial. O caldo em seguida é fermentado por leveduras para obtenção de etanol. A partir deste processo é obtido o etanol de primeira geração, oriundo dos açúcares previamente disponíveis. Os outros 30% do volume inicial compõem um resíduo lignocelulósico denominado bagaço, que é, atualmente, queimado para gerar energia elétrica para as usinas de etanol (NOVACANA, 2018). Portanto, a produção de etanol a partir do bagaço desfruta, em princípio, da disponibilidade de biomassa para ser transformada (SCARCELLA, 2016).

## 1.3 O bagaço da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar tem sua massa seca composta por, em média, 36% de celulose, 28% de hemicelulose, 20% de lignina e 13% de outros compostos orgânicos (TEW; COBILL, 2008). A celulose é um composto polimérico linear formado por unidades de D-glicopiranoses unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4, sendo a celobiose a sua menor unidade repetitiva. Este polímero apresenta uma conformação cristalina, o que torna a celulose resistente à ação de microrganismos. A hemicelulose é também um composto polimérico, porém heterogêneo e formado por unidades de D-xilose, L-arabinose, D-manose, D-glicose, D-galactose e açúcares ácidos, contendo ramificações saindo da cadeia principal de xilose, que também se mantém unida por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4. É potencialmente possível sacarificar tanto a celulose quanto a hemicelulose, obtendo-se açúcares que podem ser fermentados em etanol em larga escala. A lignina, entretanto, consiste em uma cadeia irregular de compostos fenólicos: álcool cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico. Este polímero confere à parede celular vegetal resistência a ataques microbianos, representando um empecilho à sacarificação e à fermentação (KUMAR; SINGH; SINGH, 2008; SCARCELLA, 2016).

A parede celular vegetal também é composta, em menores quantidades, pelo heteropolímero pectina. A cadeia principal da pectina é formada por unidades de ácido homogalacturônico, podendo apresentar ramificações de ramnose, arabinose, xilose e galactose. Além da pectina ser utilizada nas indústrias alimentícia e têxtil, este polímero pode ser hidrolisado e posteriormente fermentado, assim como a celulose e a hemicelulose (BRUMMELL, 2006; KUMAR; SINGH; SINGH, 2008).

## 1.4 Produção de etanol 2g

O etanol produzido a partir de resíduos lignocelulósicos é conhecido como etanol de segunda geração. Para obter etanol destes resíduos são necessárias as seguintes etapas: o pré-tratamento; a hidrólise; a fermentação dos açúcares derivados da sacarificação da biomassa; separação e tratamento do líquido. Entretanto, apesar dos métodos para

produção de etanol de segunda geração serem conhecidos, a tecnologia atual não permite que a produção de etanol a partir de resíduos lignocelulósicos seja economicamente viável (SOCCOL et al., 2010).

O pré-tratamento é fundamental para a conversão de biomassa em etanol. Seu objetivo é reduzir as interações entre os principais componentes da parede celular, liberando a celulose e a hemicelulose para serem hidrolisadas e fermentadas sem que substâncias inibidoras sejam formadas. Existem diversos tipos de pré-tratamentos como lavagem alcalina ou hidrólise ácida. Entretanto, o pré-tratamento mais utilizado para o bagaço da cana é a explosão com vapor, que consiste na exposição da biomassa ao vapor em alta pressão e alta temperatura, com isso o vapor adentra o material vegetal e se condensa, formando água líquida. Em seguida ocorre uma súbita descompressão, levando a água a rapidamente evaporar, desestruturando os componentes da parede celular e tornando-os mais acessíveis para a sacarificação (SOCCOL et al., 2010; TOMÉ, 2014).

A hidrólise, ou sacarificação, consiste na quebra dos polímeros de celulose e hemicelulose em pentoses e hexoses que podem passar por fermentação alcoólica. A hidrólise pode ser química, sendo realizada por ácidos ou bases, ou enzimática, efetuada por diversas enzimas oriundas de fungos filamentosos que atuam de forma sinérgica. A hidrólise enzimática é considerada mais limpa, pois o surgimento de compostos inibidores do crescimento de leveduras é menor e, portanto, mais adequada à produção (SCARCELLA, 2016).

A fermentação alcoólica é o processo a partir do qual o etanol é obtido, sendo catalisada por leveduras. A fermentação pode ocorrer de duas diferentes formas: separada da hidrólise ou simultânea à hidrólise. A fermentação separada leva a um acúmulo de glicose, inibindo a posterior atividade enzimática, o que não ocorre na hidrólise e fermentação simultâneas, pois a glicose é prontamente convertida em etanol. Entretanto, na fermentação simultânea à hidrólise não é possível que as condições ótimas de temperatura sejam atingidas para a atividade enzimática (~50 °C) e para a fermentação (~30 °C). Portanto não há conclusões sobre qual método é mais eficiente (SOCCOL et al., 2010; SCARCELLA, 2016).

## 1.5 As enzimas fúngicas

Para que a produção de etanol de segunda geração torne-se economicamente viável e comece a ser realizada em escalas industriais, é necessário que um coquetel enzimático capaz de hidrolisar polímeros de celulose e hemicelulose de forma eficiente seja desenvolvido. Isto representa um dos grandes desafios frente à produção de etanol de segunda geração. Certos fungos filamentosos são capazes de produzir celulases e hemicelulases e por isso há uma grande quantidade de estudos relacionados à produção de enzimas a partir de fungos como os do gênero *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Mycothermus*, entre outros (SCARCELLA, 2016; SHIELDS, BOOPATHY, 2010).

As enzimas catalizadoras da hidrólise da celulose, conhecidas como celulases, são divididas em três principais tipos: as  $\beta$ -glucosidases (EC 3.2.1.21), as endoglucanases (EC 3.2.1.4) e as celobiohidrolases (EC 3.2.1.176, CBHI; EC 3.2.1.91, CBHII). Cada uma dessas enzimas atua sobre uma área específica das moléculas de celulose. As endoglucanases, como o nome indica, clivam ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 aleatórias presentes no interior das cadeias de celulose. As celobiohidrolases, também conhecidas como exoglucanases, rompem as ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 presentes nas extremidades das cadeias de celulose, sendo que a CBHI atua em extremidades não redutoras, enquanto a CBHII atua em extremidades redutoras. A ação desta enzima libera celobioses que, por sua vez, sofrem a ação de  $\beta$ -glucosidases, liberando glicose. As  $\beta$ -glucosidases também são capazes de atuar sobre oligossacarídeos compostos por até seis monômeros de glicose (SCARCELLA, 2016; KUMAR; SINGH; SINGH, 2008).

Sendo a hemicelulose composta por uma cadeia principal de xilose contendo diversas ramificações com diferentes açúcares, é necessária a ação sinérgica de várias enzimas que clivam as diversas ligações presentes neste heteropolímero. A enzima endo- $\beta$ -1,4-xilanase (EC 3.2.1.8) realiza a quebra de ligações glicosídicas internas à cadeia principal, reduzindo o tamanho destes polímeros. A  $\beta$ -xilosidase (EC 3.2.1.37) cliva xilobiose, que, de forma análoga à celobiose, é a menor unidade repetitiva da xilana, liberando a pentose xilose. Outras enzimas como  $\alpha$ -arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) e  $\alpha$ -glucuronidase (EC 3.2.1.139) também atuam clivando as ligações entre as ramificações de L-arabinose e ácido glucurônico, respectivamente (SCARCELLA, 2016; KUMAR; SINGH; SINGH, 2008).

A hidrólise da pectina depende da ação sinérgica de enzimas como a pectinase, polimetil galacturonase, endo-poligalacturonase, exo-poligalacturonase e exo-poligalacturanosidase. Essas enzimas são responsáveis pela quebra da cadeia principal da pectina. Já as ramificações são hidrolisadas pelas enzimas  $\alpha$ -L-ramnosidases e  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases (KUMAR; SINGH; SINGH, 2008).

Neste trabalho a produção de enzimas foi feita em meios de cultivo suplementados com outro resíduo agroindustrial relevante, o sabugo e a palha de milho. A produção de milho no Brasil vem crescendo aproximadamente 3% ao ano nas últimas décadas (EMBRAPA, 2015), com projeção de produção total de 95 milhões de toneladas no ano de 2019 (PORTAL DO GOVERNO DO BRASIL, 2019). O sabugo e a palha de milho são resíduos lignocelulósicos que apresentam grandes quantidades de celulose e hemicelulose, representando aproximadamente 35% e 39% de sua composição, respectivamente (LIU et al., 2010; IOANNIDOU et al., 2009). A composição e a disponibilidade destes resíduos seguem seu potencial para uso na produção de enzimas relacionadas à produção de etanol 2G.

## 2 | OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

Elaboração de um coquetel enzimático capaz de hidrolisar resíduos lignocelulósicos desenvolvido a partir de fontes de indução de baixo custo visando à produção de etanol.

### 2.2 Objetivos específicos

- Produção de celulases, xilanases e pectinases pelos fungos *Trichoderma reesei* RP98 e *Mycothermus thermophilus*;
- Verificar a produção enzimática pelos fungos em função do tempo (dias) de cultivo;
- Caracterização bioquímica das enzimas;

## 3 | MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Manutenção das cepas

Para realizar a manutenção das cepas de *Trichoderma reesei* RP98 e *Mycothermus thermophilus* foram feitos repiques periódicos em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio batata-dextrose-ágar (BDA) e 5 mL de meio composto por 4 g de farinha de aveia, 2 g de ágar e 1 g de glicose para 100 mL de água destilada, ambos esterilizados. Os tubos contendo *Trichoderma reesei* RP98 foram mantidos em estufas a 30° C e os tubos contendo *Mycothermus thermophilus* a 40°C durante sete dias. Passados estes dias, os tubos contendo *T. reesei* foram guardados na geladeira e os tubos contendo *M. thermophilus* em estufa a 25° C.

### 3.2 Produção enzimática

A produção enzimática foi realizada a partir de uma solução de 1 mL contendo  $10^7$  esporos de *T. reesei* ou de *M. thermophilus*, sendo a contagem realizada em câmara de Neubauer. Este volume da solução foi adicionado a um Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio mínimo (BARRATT et al., 1965) e suplementado com 1% de palha ou sabugo de milho.

Os frascos contendo *T. reesei* foram incubados a 30 °C e os frascos contendo *M. thermophilus* foram incubados a 40 °C, 120 rpm, durante 7 dias. Amostras de 1 mL foram retiradas a cada 24 horas para que a dosagem enzimática fosse realizada.

### 3.3 Dosagem enzimática

Foram dosadas as atividades de endoglucanases, xilanases e pectinase através da formação e detecção de açúcares redutores a partir de seus substratos pelo método do

ácido 3,5-dinitrosalicílico, DNS (MILLER, 1959).

Para a dosagem de endoglucanase, foram adicionados às microplacas 25  $\mu\text{L}$  do substrato carboximetilcelulose 1% (CMC), 15  $\mu\text{L}$  de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e 10  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático. A reação ocorreu no termociclador a 50 °C por 20 minutos.

Para a dosagem de xilanase, foram adicionados às microplacas 25  $\mu\text{L}$  do substrato Xilana beechwood 1%, 15  $\mu\text{L}$  de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e 10  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático diluído em dez vezes no mesmo tampão. A reação ocorreu no termociclador a 50 °C por 5 minutos.

Para a dosagem de pectinase, foram adicionados às microplacas 50  $\mu\text{L}$  de tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,0 contendo 1% de ácido poligalacturônico e 50  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático. A reação ocorreu no termociclador a 50 °C por 10 minutos. Após o término do tempo de reação, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de DNS (ácido dinitrosalicílico), que indica presença de açúcares redutores, às microplacas que estavam contendo CMC e Xilana, que depois voltaram para o termociclador por 5 minutos a 98 °C.

O conteúdo das microplacas que continham ácido poligalacturônico foi transferido para tubos de ensaio contendo 100  $\mu\text{L}$  de DNS, que foram levados a banho-maria por 5 minutos à 98 °C. Após terminados os 5 minutos de fervura no banho-maria, foi adicionado 1 mL de água a cada tubo. O conteúdo dos tubos foi centrifugado por 1,5 minutos a 10000 g. Em seguida foram retirados 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante para a leitura ser realizada

Para o branco o extrato enzimático foi adicionado somente após a adição de DNS e no mesmo mesmo volume adicionado às outras reações.

A absorbância foi determinada em leitor de microplacas para um comprimento de onda de 540 nm. Para o cálculo da atividade enzimática foi utilizada uma curva padrão de glicose (1 mg/mL), xilose (1 mg/mL) e ácido galacturônico (1 mg/mL). Uma unidade (U) de atividade enzimática fica definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor por minuto, nas condições de ensaio.

As determinação das atividades de celobiohidrolases (CBH) e  $\beta$ -glucosidases foram feitas a partir da clivagem de substratos sintéticos, p-nitrofenilcelobiosídeo (pNPC) e p-nitrofenilglicopiranosídeo (pNPG), respectivamente. Para tanto, foram adicionados às microplacas 25  $\mu\text{L}$  de substrato 2 mM, 15  $\mu\text{L}$  de tampão de acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e 10  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático. A reação ocorreu a 50 °C por 10 minutos no termociclador. Em seguida foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de carbonato de cálcio 0,2 M. O branco foi realizado com a incubação de substrato e tampão, sendo a enzima adicionada somente após a adição de carbonato de sódio.

A absorbância foi determinada em leitor de microplacas a 410 nm. Foi utilizado para cálculo uma curva padrão com p-nitrofenol. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de produto por minuto, nas condições de ensaio.

### 3.4 Caracterização bioquímica

Foi realizada a caracterização de temperatura e pH ótimos na ação enzimática dos extratos de *T. reesei* e *M. thermophilus* obtidos após 5 dias de cultivo e dos extratos retirados nos dias em que maior atividade enzimática foi calculada.

Para isso, a dosagem enzimática foi realizada conforme descrito no item 3.3 porém as temperaturas de reação variaram entre 30 e 70 °C, com intervalos de 5 °C, e o pH variou entre 3 e 8 com intervalos de 0,5. Nessa etapa foram utilizadas soluções de tampão McIlvaine (VILLELA et al., 1973).

### 3.5 Dosagem de proteínas

A quantificação de proteínas foi feita utilizando o reagente de Bradford (BioRad) conforme descrito: 160 µL de extrato enzimático de meio de cultivo adicionados a 40 µL do reagente. A reação ocorreu em temperatura ambiente durante cinco minutos e a absorbância foi lida em 595 nm.

## 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Produção de enzimas em função do tempo de cultivo

Foram determinados em quais dias as atividades de cada enzima atingiam seu valor máximo dentro de um período de 7 dias. As atividades enzimáticas dos extratos obtidos de *T. reesei* podem ser observadas juntamente com as atividades específicas na figura 1. Nos cultivos com *Trichoderma reesei*, foram constatadas maiores atividades de todas as enzimas após 6 dias de cultivo. Algumas exceções apresentaram atividade equivalente após 7 dias de cultivo, como a xilanase cultivada em palha de milho e a β-glucosidase produzida em sabugo de milho. A celobiohidrolase (CBH), entretanto, apresentou maior atividade após 7 dias de cultivo, tanto para sabugo como para a palha de milho.

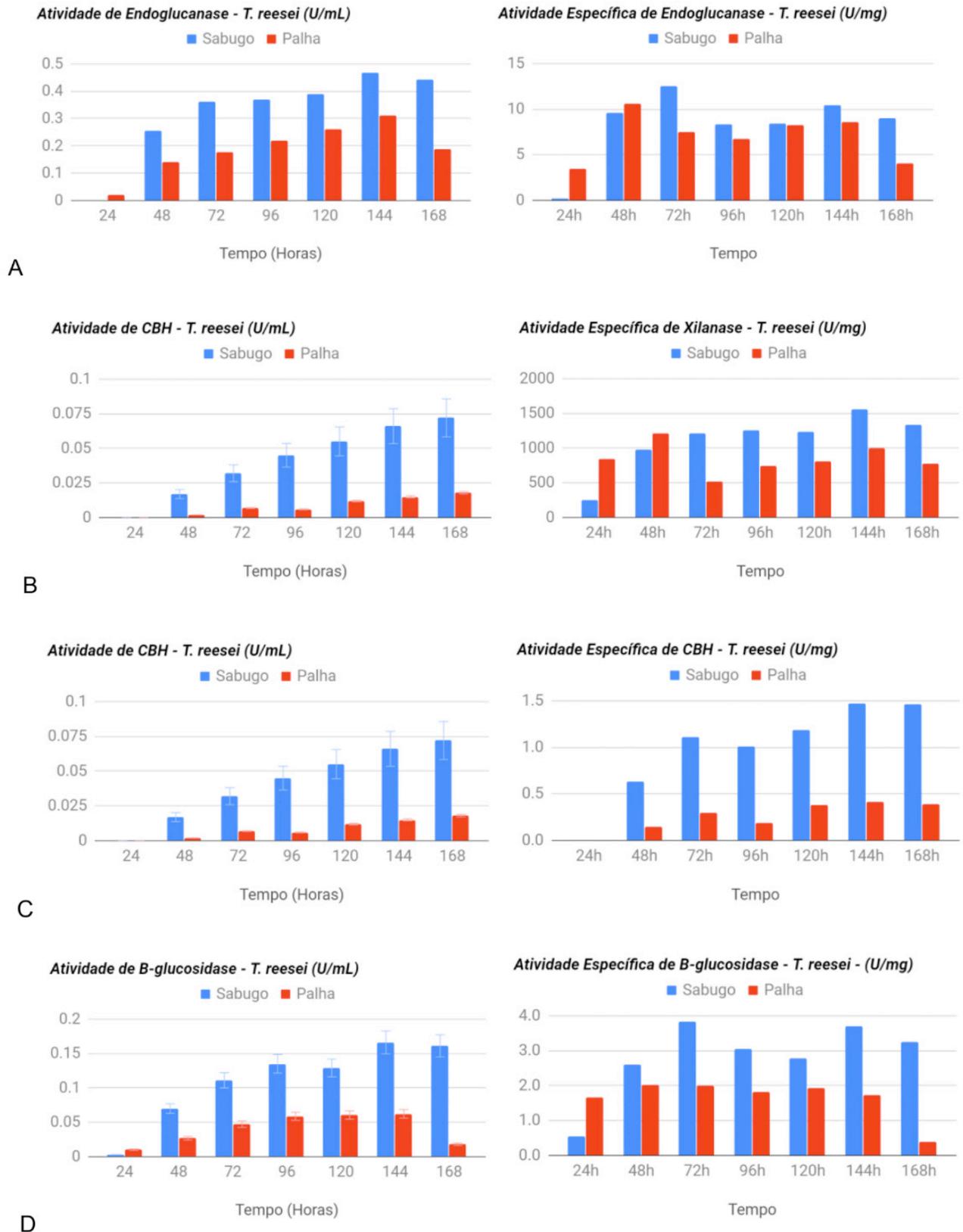


Figura 1. Produção enzimática do fungo *Trichoderma reesei* RP98: (A) endoglucanase; (B) xilanase; (C) celobiohidrolase e (D)  $\beta$ -glucosidase.

Quando comparadas as atividades verificadas entre os cultivos com sabugo e palha de milho observa-se, claramente, uma maior atividade com o implemento de sabugo de milho para todas as enzimas analisadas: para a endoglucanase (6 dias), 0,47 U/mL com sabugo e 0,31 U/mL com palha (figura 1.A); para a xilanase (6 dias), 70,1 U/mL com

sabugo e 36 U/mL com palha (figura 1.B); para a celobiohidrolase (7 dias), 0.072 U/mL com sabugo e 0,018 U/mL com palha (figura 1.C); e para a  $\beta$ -glucosidase (6 dias), 0,166 com sabugo e 0,062 com palha (figura 1.D).

Também foi observada maior atividade específica para os extratos de cultivos sabugo de milho. Para a endoglucanase foi observado um valor máxima de 12.5 U/mg após 3 dias de cultivo com sabugo e 10.6 U/mg após dois dias de cultivo com palha (figura 1.A). Para a xilanase, o valor máximo atingido foi de 1560 U/mg após 6 dias de cultivo com sabugo e 1212 U/mg após dois dias de cultivo com palha (figura 1.B). Os valores observados para a celobiohidrolase atingiram máximos de 1.47 U/ mg após 6 dias de cultivo com sabugo e 0.42 U/mg após 6 dias com palha (figura 1.C). Para a endoglucanase, os valores máximos verificados ocorreram após 3 dias de cultivo, tanto para o sabugo com para a palha, com 3.84 U/mg e 2 U/mg, respectivamente (figura 1.D).

O mesmo foi feito para os cultivos com *Mycothermus thermophilus*. As atividades enzimáticas dos extratos obtidos de *M. thermophilus* podem ser observadas juntamente com as atividades específicas na figura 2. Foi verificada maior atividade enzimática para as quatro enzimas após 7 dias de cultivo, embora atividades equivalentes foram constatadas para a endoglucanase obtida após 6 dias com sabugo de milho e para a xilanase obtida após 6 dias com palha de milho.

Quando comparados as atividades enzimáticas averiguadas entre os cultivos de *M. thermophilus* com sabugo e palha de milho, observou-se o oposto do que aconteceu com *T. reesei*. Os extratos obtidos dos cultivos com palha de milho apresentaram maior atividade enzimática: para a endoglucanase (7 dias), 0,29 U/mL com palha e 0,17 com sabugo (figura 2.A); para a CBH (7 dias), 0,17 U/mL com palha e 0,08 U/mL com sabugo (figura 2.C); e para a  $\beta$ -glucosidase (7 dias), 0,39 U/mL com palha e 0,26 U/mL com sabugo (figura 2.D). A exceção foi atividade verificada para a xilanase (7 dias), 19 U/mL com palha e 26,4 U/mL com sabugo (figura 2.B).

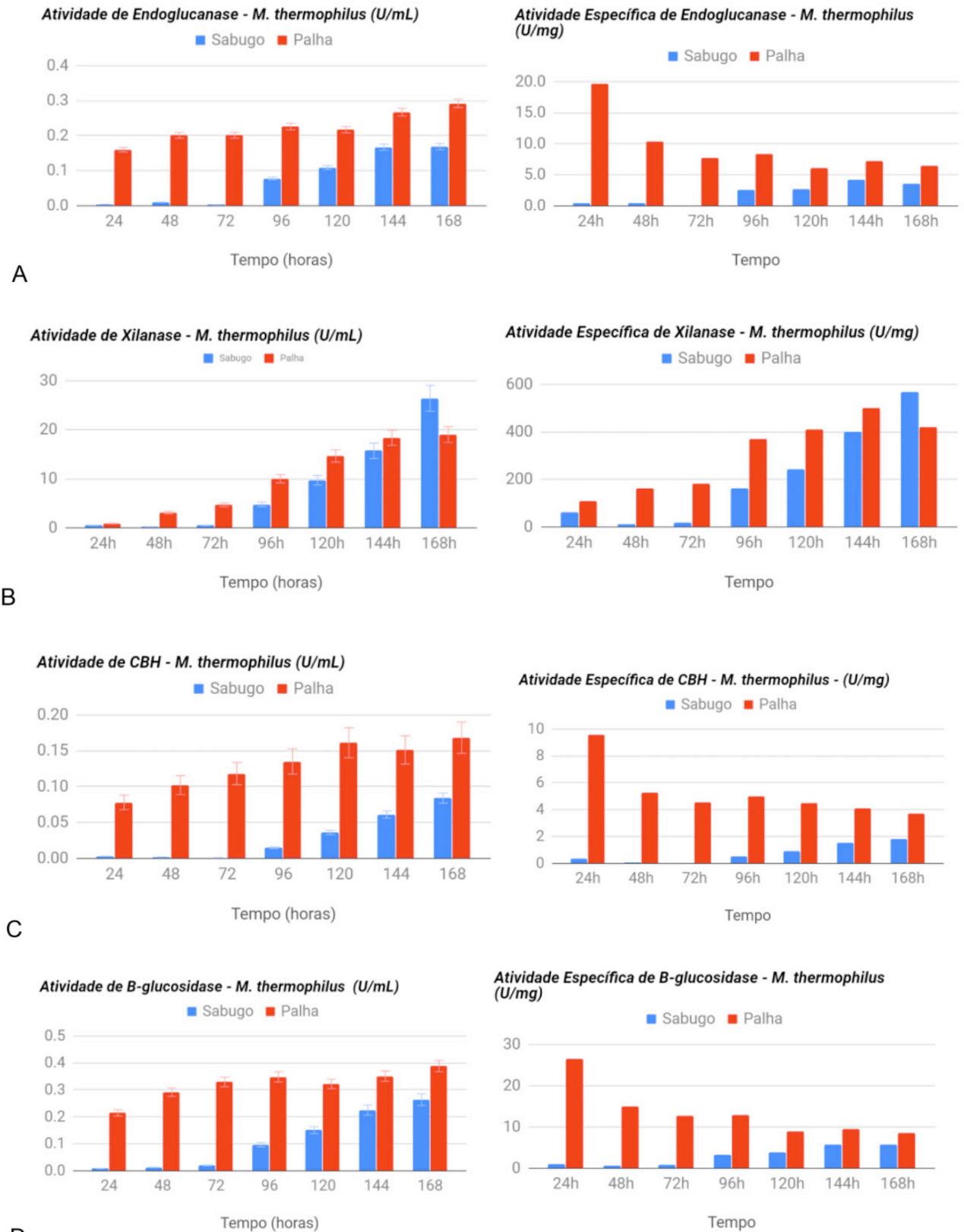


Figura 2. Produção enzimática do fungo *Mycothermus thermophilus*: (A) endoglucanase; (B) xilanase; (C) celobiohidrolase e (D) β-glucosidase.

Foi observada também uma alta atividade enzimática de endoglucanase, CBH e β-glucosidase nos cultivos com palha de milho logo após 24 horas de cultivo, representando 54,8%, 46,4% e 55,3% da atividade observada após 7 dias, respectivamente. Isso resultou em uma atividade específica dessas enzimas muito elevada nos primeiros dias de cultivo

com palha. O mesmo não foi observado nem na atividade da xilanase e nem nos cultivos com sabugo de milho.

Para os extratos de cultivos com palha de milho, foi observada maior atividade específica no primeiro dia e, posteriormente, um declínio (figura 2). O mesmo não ocorreu com os extratos de cultivos com sabugo de milho, nos quais os maiores valores foram obtidos nos últimos dias de cultivo. A xilanase entretanto apresentou comportamento diferente, com maior atividade específica nos últimos dias de cultivo tanto para os extratos de cultivo com palha como sabugo de milho. Para a endoglucanase foi observado um valor máximo de 19.7 U/mg após um dia de cultivo com palha e 4.3 U/mg após 7 dias de cultivo com sabugo. Para a xilanase o valor máximo atingido foi de 499 U/mg após 6 dias de cultivo com palha e 568 U/mg após 7 dias de cultivo com sabugo. Para a celobiohidrolase o valor máximo de atividade específica calculado foi de 9.6 U/mg após um dia de cultivo com palha de milho e 1.8 U/mg após 7 dias de cultivo com sabugo de milho. Para a  $\beta$ -glucosidase o valor máximo foi de 26.4 U/mg após um dia de cultivo com palha de milho e 5.8 U/mg após 6 dias de cultivo com sabugo de milho.

Quando comparadas as produções de enzimas entre *T. reesei* e *M. thermophilus*, verifica-se que *T. reesei* apontou maior produção de endoglucanase e de xilanase enquanto *M. thermophilus* apresentou maior produção de celobiohidrolase e de  $\beta$ -glucosidase. Na tabela 1 são comparados os valores máximos de atividade enzimática de cada fungo filamentosos para cada enzima.

Os dados para a endoglucanase se mostram semelhantes aos publicados por METREVELI et al. (2017), porém baixos quando comparados com os resultados obtidos em SHARMA et al. (2017), tanto para os cultivos com *Trichoderma reesei* como para os cultivos com *Mycothermus thermophilus*. A xilanase, entretanto, apresentou valores superiores aos publicados por BHALLAS, BISCHOFF e SANI (2015) e KSHIRSAGAR et al. (2015), especialmente para o cultivo de *Trichoderma reesei* com sabugo de milho. Os resultados para a celobiohidrolase se mostraram um pouco abaixo dos obtidos com *Aspergillus niger* por XUE et al. (2017), o mesmo aconteceu para a  $\beta$ -glucosidase, quando comparada com os dados de SHARMA et al. (2017).

Também foi tentado determinar os dias em que a atividade de pectinase era máxima para cada um dos cultivos feitos. Entretanto não foi verificada atividade enzimática em nenhum dos cultivos, tanto dos extratos obtidos a partir de *T. reesei* como de *M. thermophilus*. Pode-se observar as atividades enzimáticas registradas na tabela 2.

	Endoglucanase (U/mL)	Xilanase (U/mL)	Celobiohidrolase (U/mL)	$\beta$ -glucosidase (U/mL)
<i>T. reesei</i> - sabugo	0,47 $\pm$ 0,05	70,10 $\pm$ 7,70	0,07 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,02
<i>T. reesei</i> - palha	0,31 $\pm$ 0,40	36,00 $\pm$ 1,60	0,02 $\pm$ 0,00	0,06 $\pm$ 0,02
<i>M. thermophilus</i> - sabugo	0,17 $\pm$ 0,01	26,4 $\pm$ 2,82	0,08 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,02
<i>M. thermophilus</i> - palha	0,29 $\pm$ 0,01	19,00 $\pm$ 1,61	0,17 $\pm$ 0,02	0,39 $\pm$ 0,02

Tabela 1: valores máximos atividade enzimática de *T. reesei* e *M. thermophilus*

	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h
<i>T. reesei</i> - sabugo	0,061 $\pm$ 0,080	0,001 $\pm$ 0,001	0,007 $\pm$ 0,013	0,033 $\pm$ 0,660	0,056 $\pm$ 0,064	0,005 $\pm$ 0,009	0,005 $\pm$ 0,009
<i>T. reesei</i> - palha	0,007 $\pm$ 0,014	0,083 $\pm$ 0,056	0,078 $\pm$ 0,092	0,067 $\pm$ 0,080	0,076 $\pm$ 0,069	0,037 $\pm$ 0,027	0,068 $\pm$ 0,063
<i>M. thermophilus</i> - sabugo	0,016 $\pm$ 0,031	0,002 $\pm$ 0,003	0,025 $\pm$ 0,023	0,029 $\pm$ 0,056	0,027 $\pm$ 0,051	0,022 $\pm$ 0,039	0,038 $\pm$ 0,057
<i>M. thermophilus</i> - palha	0,014 $\pm$ 0,026	0,013 $\pm$ 0,018	0,014 $\pm$ 0,022	0,014 $\pm$ 0,028	0,008 $\pm$ 0,011	0,013 $\pm$ 0,021	0,026 $\pm$ 0,033

Tabela 2: atividade enzimática de pectinase (U/mL) com desvio padrão em função do tempo de cultivo

Os altos valores dos coeficiente de variação, razão entre desvio padrão e média, frequentemente acima de 1, indicam que não houve atividade enzimática de pectinase considerável. Contudo, isso não indica que *T. reesei* e *M. thermophilus* não sejam capazes de produzir pectinase. A ausência de pectina nos substratos sabugo e palha de milho (LIU et al., 2010) pode ser um dos motivos para que a enzima não fosse produzida. Produção de pectinase foi verificada por *T. reesei* em substratos diferentes (OLSSON et al., 2003).

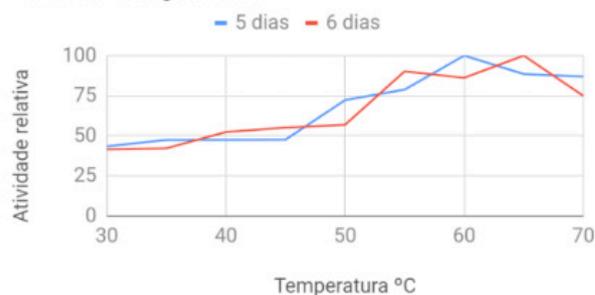
## 4.2 Caracterização bioquímica das enzimas

Com exceção da pectinase, que não apresentou atividade enzimática significativa, foi feita a caracterização bioquímica das enzimas analisadas, determinando temperatura e pH ótimos.

### 4.2.1 Temperatura ótima

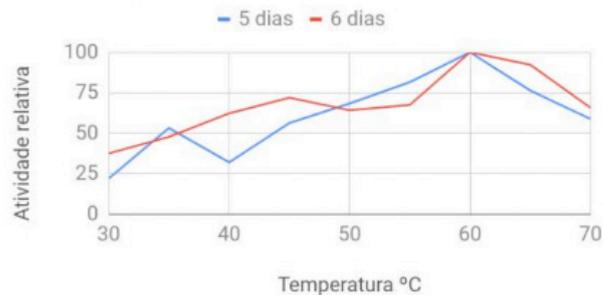
Todas as enzimas tiveram a temperatura ótima determinada, tanto do fungo *T. reesei* (figura 3 e 4), quanto do *M. thermophilus* (figura 5 e 6). Para a determinação da temperatura ótima de ensaio enzimático, as enzimas foram incubadas com seus substratos específicos, em diferentes temperaturas que variaram de 30 °C a 75 °C, com variação de 5°C.

Atividade relativa de endoglucanase em função da temperatura - *T. reesei* - Sabugo de milho



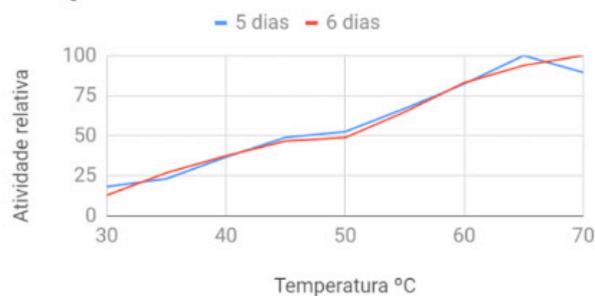
A

Atividade relativa de xilanase em função da temperatura - *T. reesei* - Sabugo de milho



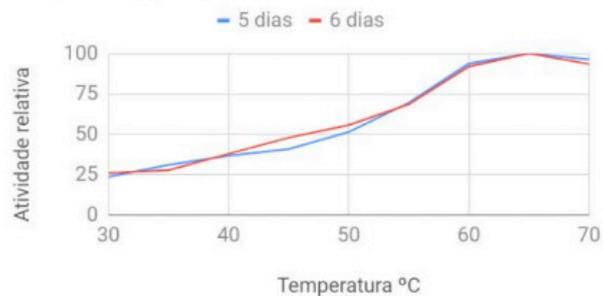
B

Atividade relativa de CBH em função da temperatura - *T. reesei* - Sabugo de milho



C

Atividade relativa de B-glucosidase em função da temperatura - *T. reesei* - Sabugo de milho

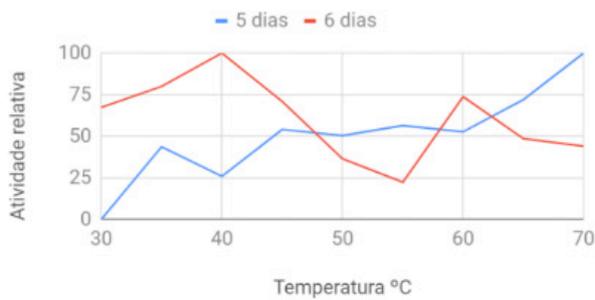


D

Figura 3. Atividade relativa em função da temperatura das enzimas endoglucanase (A), xilanase (B), CBH (C) e  $\beta$ -glucosidase (D) de *Trichoderma reesei* RP98 em meio suplementado com sabugo de milho.

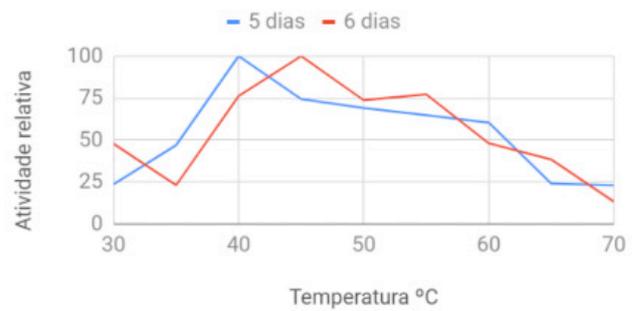
A endoglucanase de *T. reesei* obtida do sabugo de milho apresentou elevada atividade enzimática de 55 a 65°C, sendo a melhor temperatura 60°C para o extrato de 5 dias de cultivo e 65 °C para o de 6 dias (figura 3A). As outras duas celulases estudadas também apresentaram elevada nesta faixa de temperatura, a celobiohidrolase apresentou atividade máxima a 65 °C para o extrato de 5 dias e 70 °C para o extrato de 6 dias (figura 3C), e a B-glucosidase apresentou atividade máxima a 65 °C para os dois extratos (figuras 3D). SILVA et al. (2013), YUAN et al. (2015) e PELLEGRINI et al. (2015) estudaram celulases com máxima atividade na faixa de 50 a 65°C, dados que corroboram com os resultados obtidos. As temperaturas ótimas para a xilanase, curiosamente, também se encontram nessa faixa de temperatura, 60 °C tanto para o extrato de 5 dias como para o de 6 dias (figuras 3B).

Atividade relativa de endoglucanase em função da temperatura - *T. reesei* - Palha de milho



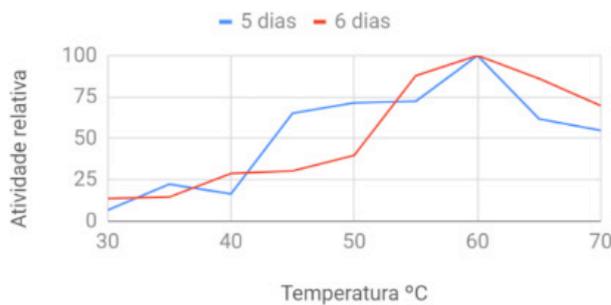
A

Atividade relativa de xilanase em função da temperatura - *T. reesei* - Palha de milho



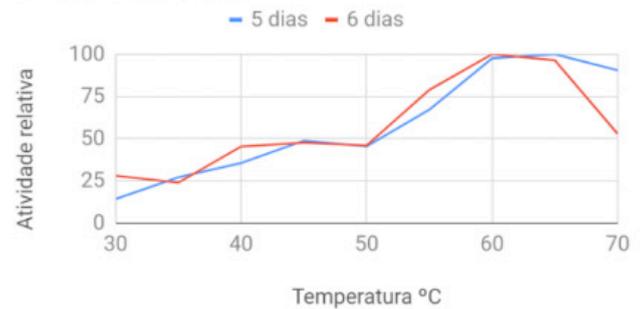
B

Atividade relativa de CBH em função da temperatura - *T. reesei* - Palha de milho



C

Atividade relativa de  $\beta$ -glucosidase em função da temperatura - *T. reesei* - Palha de milho



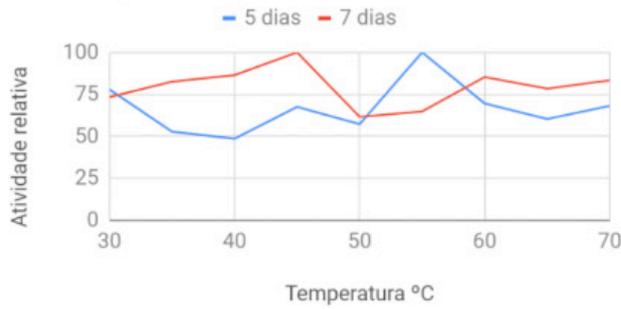
D

Figura 4. Atividade relativa em função da temperatura das enzimas endoglucanase (A), xilanase (B), CBH (C) e  $\beta$ -glucosidase (D) de *Trichoderma reesei* RP98 em meio suplementado com sabugo de milho.

Para o cultivo em meio suplementado com palha de milho, também foi observada elevada atividade enzimática para temperaturas entre 60 °C e 70 °C (figura 4). A celobiohidrolase apresentou atividade máxima a 60 °C (figura 4C) para os dois extratos e a  $\beta$ -glucosidase apresentou atividade máxima a 60 °C e 65 °C para os extratos de 6 e 5 dias de cultivo, respectivamente (figura 4D). Entretanto, houve divergência em alguns pontos quando comparados os cultivos com sabugo e palha de milho. Foi observada atividade máxima de xilanase a 40 °C para o extrato de 5 dias e 45 °C para o extrato de 6 dias (figura 4B). Também foi verificada uma atividade máxima de endoglucanase a 40 °C para o extrato de 6 dias, enquanto a temperatura ótima da endocelulase para o extrato de 5 dias foi de 70 °C (figura 4A).

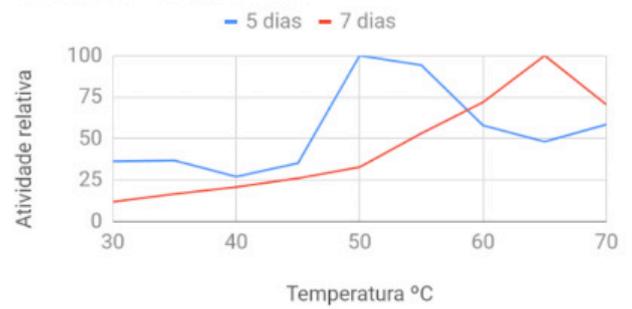
Para as enzimas de *Mycothermus thermophilus* também foi observada uma predominância de temperaturas ótimas elevadas (figuras 5 e 6), embora estas tenham apresentado um padrão mais heterogêneo quando comparadas com as temperaturas ótimas das enzimas de *Trichoderma reesei*.

Atividade relativa de endoglucanase em função da temperatura - *M. thermophilus* - Sabugo de milho



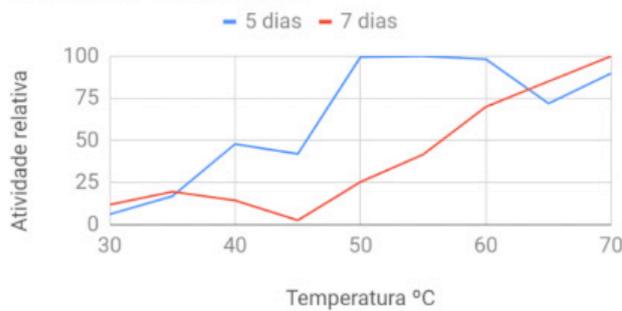
A

Atividade relativa de xilanase em função da temperatura - *M. thermophilus* - Sabugo de milho



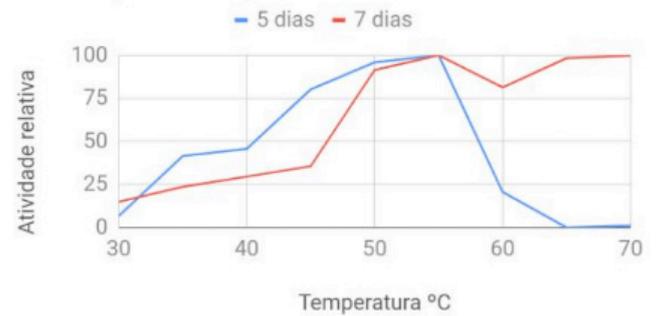
B

Atividade relativa de CBH em função da temperatura - *M. thermophilus* - Sabugo de milho



C

Atividade relativa de B-glucosidase em função da temperatura - *M. thermophilus* - Sabugo de milho

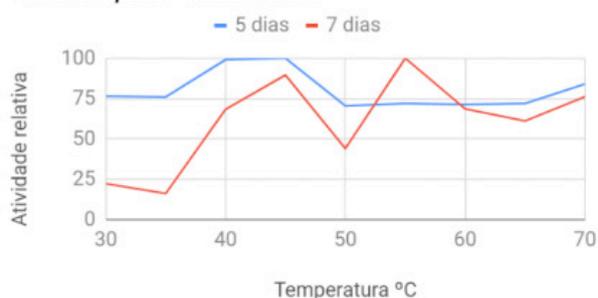


D

Figura 5. Atividade relativa em função da temperatura das enzimas endoglucanase (A), xilanase (B), CBH (C) e  $\beta$ -glucosidase (D) de *Mycothermus thermophilus* em meio suplementado com sabugo de milho.

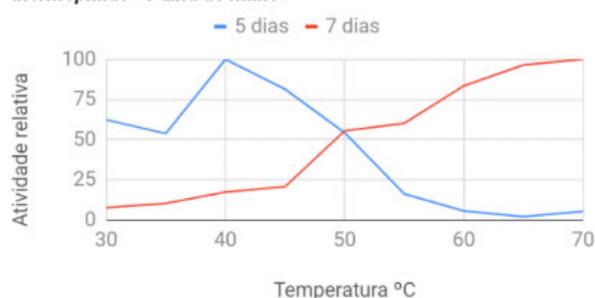
Nos cultivos com meio suplementado com sabugo de milho, as temperaturas ótimas verificadas para a endocelulase foram de 55 °C para o extrato de 5 dias e 45 °C para o extrato de 7 dias, com atividade relativa acima de 78% para o intervalo entre 60 °C e 70 °C (Figura 5A). Para a xilanase, foram observadas temperaturas ótimas de 50 °C para o extrato de 5 dias e 65 °C para o de 7 dias (figura 5B). Foram constatadas temperaturas ótimas para a celobiohidrolase de 55 °C e 70 °C para os extratos de 5 e 7 dias de cultivo, respectivamente, também foram verificadas no extrato de 5 dias atividades relativas de 99% e 98% em temperaturas de 50 °C e 60 °C, respectivamente (figura 5C). A  $\beta$ -glucosidase apresentou atividade máxima a 55 °C para os dois extratos, embora possa ser vista uma grande diferença entre os extratos na atividade relativa em temperaturas acima de 60 °C, com elevada atividade para o extrato de 7 dias e atividade praticamente nula a partir de 65 °C para o extrato de 5 dias (figura 5D).

Atividade relativa de endoglucanase em função da temperatura - *M. thermophilus* - Palha de milho



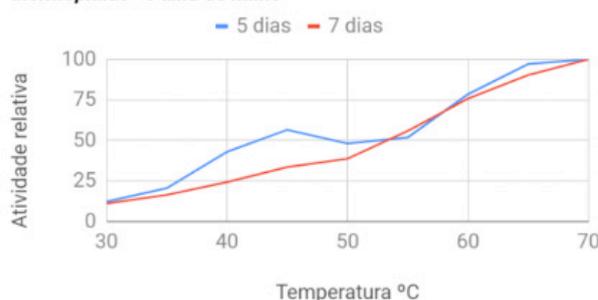
A

Atividade relativa de xilanase em função da temperatura - *M. thermophilus* - Palha de milho



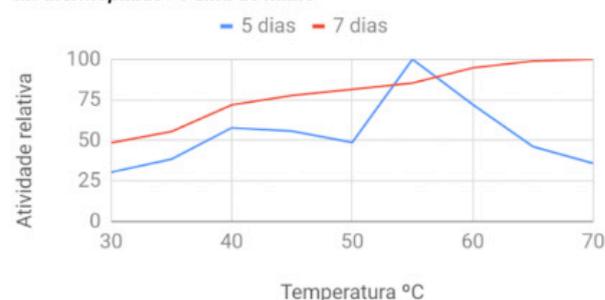
B

Atividade relativa de CBH em função da temperatura - *M. thermophilus* - Palha de milho



C

Atividade relativa de B-glucosidase em função da temperatura - *M. thermophilus* - Palha de milho



D

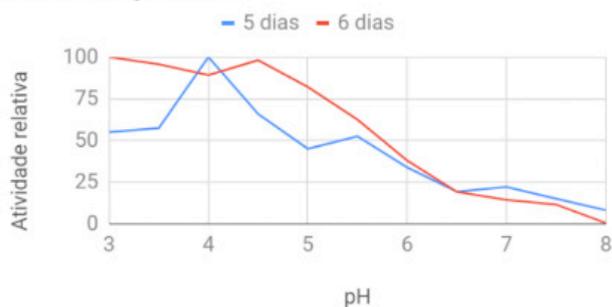
Figura 6. Atividade relativa em função da temperatura das enzimas endoglucanase (A), xilanase (B), CBH (C) e  $\beta$ -glucosidase (D) de *Mycothermus thermophilus* em meio suplementado com palha de milho.

A endoglucanase obtida do cultivo de *Mycothermus thermophilus* com palha de milho apresentou temperaturas ótimas de 45 °C e 55 °C para os extratos de 5 e 7 dias, respectivamente (figura 6A), comportamento oposto ao resultado obtido com sabugo de milho. O extrato de 5 dias também apresentou atividade relativa elevada para todas as outras temperaturas analisadas, atingindo 71% no ponto mais baixo a 60 °C. As outras celulasas apresentaram atividade elevada a temperaturas elevadas, com atividades máximas de celobiohidrolase a 70 °C para os dois extratos (figura 6C) e com atividades máximas de B-glucosidase a 55 °C e 70 °C para os extratos de 5 e 7 dias, respectivamente (figura 6D). As curvas descritas para as atividades relativas da xilanase apresentam comportamentos opostos, com o extrato de 5 dias apresentando atividade elevada até 50 °C, com atividade máxima a 40 °C, e o extrato de 7 dias apresentando atividade elevada acima de 50 °C, com atividade máxima a 70 °C.

#### 4.2.2 pH ótimo

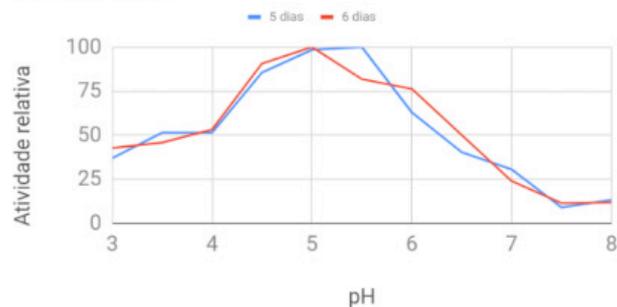
Todas as enzimas também tiveram o pH ótimo determinado, tanto do fungo *T. reesei* (figura 7 e 8), quanto do *M. thermophilus* (figura 9 e 10). Para a determinação do pH ótimo de ensaio enzimático, as enzimas foram incubadas com seus substratos específicos, em diferentes pH que variaram de 3 a 8, com variação de 0.5

Atividade relativa de endoglucanase em função do pH - *T. reesei* - Sabugo de milho



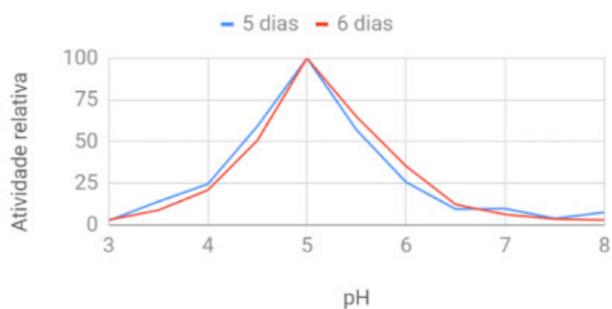
A

Atividade relativa de xilanase em função do pH - *T. reesei* - Sabugo de milho



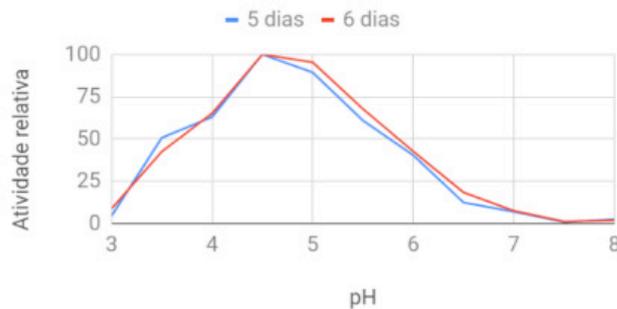
B

Atividade relativa de CBH em função do pH - *T. reesei* - Sabugo de milho



C

Atividade relativa de B-glucosidase em função do pH - *T. reesei* - Sabugo de milho

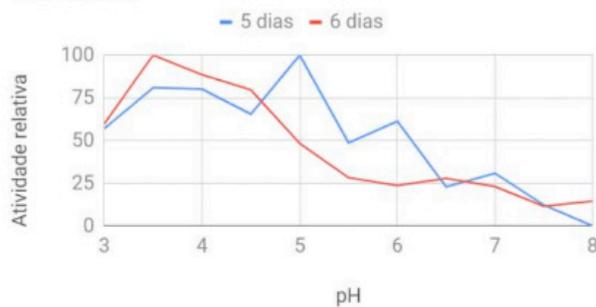


D

Figura 7. Atividade relativa em função do pH das enzimas endoglucanase (A), xilanase (B), CBH (C) e B-glucosidase (D) de *Trichoderma reesei* RP98 em meio suplementado com sabugo de milho.

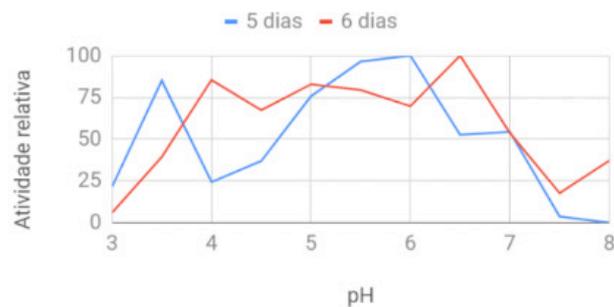
Para os extratos de *Trichoderma reesei* RP98 obtidos a partir do cultivo com sabugo de milho foi, de forma geral, observada uma homogeneidade nas curvas de atividade enzimática relativa em função do pH quando comparados os extratos de 5 e 6 dias de cultivo, com atividades ótimas em pH predominantemente baixo. A endoglucanase apresentou picos de atividade em pH 4 e pH 4,5 para os extratos de 5 e 6 dias de cultivo, respectivamente (figura 7A). A xilanase apresentou a picos em pH 5 e 5.5 para os extratos de 6 e 5 dias, respectivamente, com elevada atividade para o extrato de 5 dias em pH 5 (figura 7B). A celobiohidrolase e a  $\beta$ -glucosidase apresentaram atividades máximas em pH 4,5 e 5, respectivamente, tanto para o extrato de 5 e como para o de 6 dias nos dois casos (figura 7C e 7D).

Atividade relativa de endoglucanase em função do pH - *T. reesei* - Palha de milho



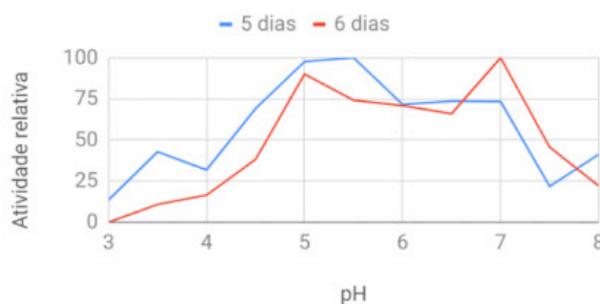
A

Atividade relativa de xilanase em função do pH - *T. reesei* - Palha de milho



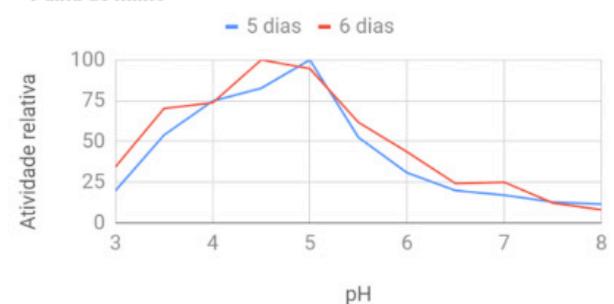
B

Atividade relativa de CBH em função do pH - *T. reesei* - Palha de milho



C

Atividade relativa de  $\beta$ -glucosidase em função do pH - *T. reesei* - Palha de milho



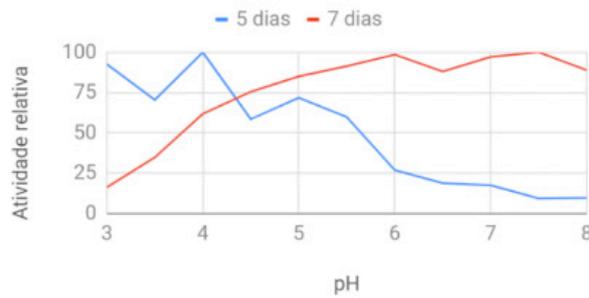
D

Figura 8. Atividade relativa em função do pH das enzimas endoglucanase (A), xilanase (B), CBH (C) e  $\beta$ -glucosidase (D) de *Trichoderma reesei* RP98 em meio suplementado com palha de milho.

O mesmo grau de homogeneidade não foi observado para as curvas de atividade relativa referentes ao *T. reesei* cultivado em palha de milho (figura 8), embora os resultados dos cultivos de 5 e 6 dias ainda apresentam grande semelhança. Também pode-se notar a ocorrência de atividades máximas em pH relativamente mais altos, em especial a xilanase, com pH ótimo de 6 para o extrato de 5 dias de cultivo e 6.5 para os extratos de 6 dias. Os pH ótimos determinados para a endoglucanase foram de 3.5 e 5 para os extratos de 5 e 6 dias, respectivamente. A celobiohidrolase apresentou valores máximos para o extrato de 5 dias em pH 5.5 e para o extrato de 6 dias em pH neutro, embora possa ser observado um pico de 90% em pH 5.

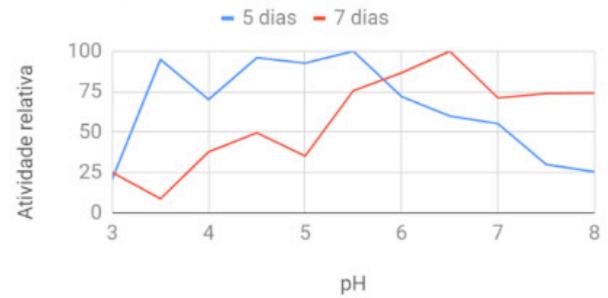
Nas figuras 9 e 10 abaixo podem ser observados os valores de pH ótimos determinados para as atividades enzimáticas dos extratos de *Mycothermus thermophilus*. Nos extratos com sabugo de milho, a endoglucanase apresentou atividade alta em pH baixo para o extrato de 5 dias, com atividade máxima em pH 4, e atividade alta em pH mais alto para o extrato de 7 dias, com atividade máxima em pH 6,5 (figura 9A). Para a xilanase também foi verificada atividade máxima em pH 6,5 para o extrato de 7 dias, o extrato de 5 dias apresentou pH ótimo de 5,5 (figura 5B). Os extratos de 5 e 7 dias apresentaram curvas de atividade relativa semelhantes para a celobiohidrolase, com atividades máximas em pH 5 e 5,5, respectivamente (figura 9C). A  $\beta$ -glucosidase apresentou pH ótimo de 3 para o extrato de 5 dias e pH ótimo de 6.5 para o extrato de 7 dias (figura 9D).

Atividade relativa de endoglucanase em função do pH - *M. thermophilus* - Sabugo de milho



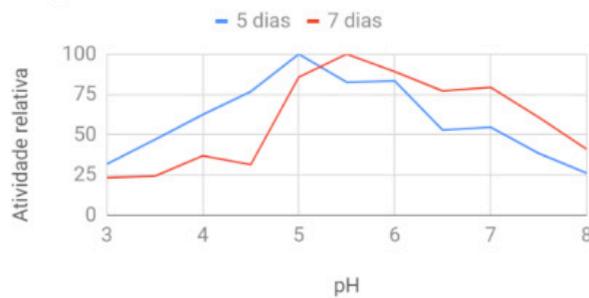
A

Atividade relativa de xilanase em função do pH - *M. thermophilus* - Sabugo de milho



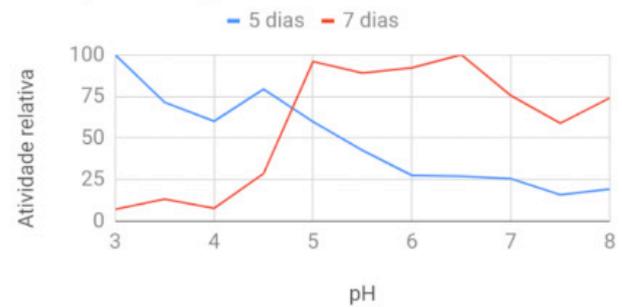
B

Atividade relativa de CBH em função do pH - *M. thermophilus* - Sabugo de milho



C

Atividade relativa de B-glucosidase em função do pH - *M. thermophilus* - Sabugo de milho



D

Figura 9. Atividade relativa em função do pH das enzimas endoglucanase (A), xilanase (B), CBH (C) e  $\beta$ -glucosidase (D) de *Mycothermus thermophilus* em meio suplementado com sabugo de milho.

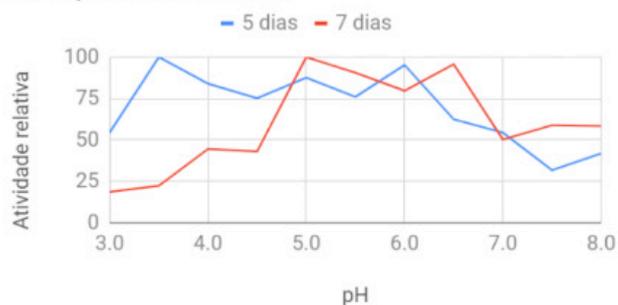
Nos cultivos com palha de milho, a endoglucanase apresentou atividades elevadas em pH baixo, com atividades máximas em pH 5 e 3 para os extratos de 5 e 7 dias, respectivamente (figura 10A). A xilanase teve atividade máxima em pH 3,5 e 5 para os extratos de 5 e 7 dias, respectivamente (figura 10B). As atividades relativas de celobiohidrolase descrevem curvas muito semelhantes para os extratos de 5 e 7 dias, com atividade máxima em pH 5 para ambos extratos (figura 10C), parecido com o verificado para o cultivo com sabugo de milho. A atividade de  $\beta$ -glucosidase do extrato de palha de milho também apresentou semelhanças com o verificado no cultivo com sabugo de milho, atividade elevada em pH baixo para o extrato de 5 dias e atividade elevada em pH mais alto para o extrato de 7 dias, com atividades máximas em pH 3,5 e 5,5, respectivamente.

Atividade relativa de endoglucanase em função do pH - *M. thermophilus* - Palha de milho



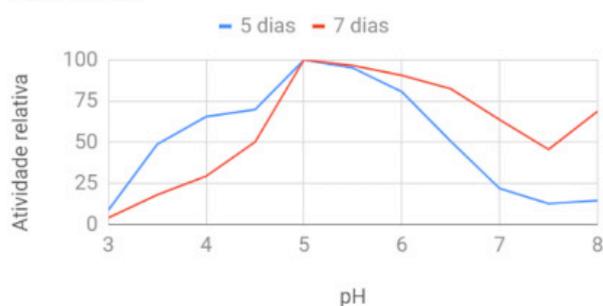
A

Atividade relativa de xilanase em função do pH - *M. thermophilus* - Palha de milho



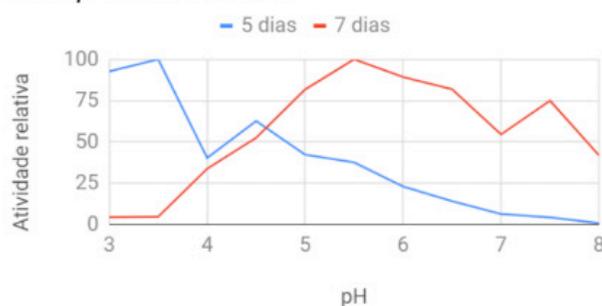
B

Atividade relativa de CBH em função do pH - *M. thermophilus* - Palha de milho



C

Atividade relativa de B-glucosidase em função do pH - *M. thermophilus* - Palha de milho



D

Figura 10. Atividade relativa em função do pH das enzimas endoglucanase (A), xilanase (B), CBH (C) e  $\beta$ -glucosidase (D) de *Mycothermus thermophilus* em meio suplementado com palha de milho.

## 5 | CONCLUSÃO

Os fungos filamentosos *Trichoderma reesei* RP98 e *Mycothermus thermophilus* apresentaram resultados satisfatórios, apontando grande potencial para degradação de compostos lignocelulósicos. Entretanto, alguns pontos ainda devem ser mais estudados, visando um incremento de eficiência nas posteriores hidrólise e obtenção de etanol 2G. Visto que os dois fungos apresentam padrões e esforços diferentes de produção de enzimas, uma possível combinação dos extratos de cultivo destes fungos pode ser muito benéfica. Os efeitos de produtos e sais nas reações também podem ser caracterizados e posteriormente aplicados, assim como os efeitos da variação de pH e de temperatura estudados neste trabalho na hidrólise enzimática da biomassa.

## REFERÊNCIAS

A GRAY, K.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M.. *Bioethanol*. Curr. Opin. Chem. Biol., v. 10, n. 2, p.141-146, 2006.

BARRATT, R.W.; et al. **Wild-type and mutant stocks of *Aspergillus nidulans***. Genetics, v. 52, p 233-246, 1965.

BHALLA A, Bischoff KM and Sani RK (2015) **Highly thermostable xylanase production from a thermophilic *Geobacillus* sp. strain WSUCF1 utilizing lignocellulosic biomass**. Front. Bioeng. Biotechnol. 3:84. doi: 10.3389/fbioe.2015.00084

- BRUMMELL, D.A. **Cell wall disassembly in ripening fruit**. *Funct. Plant Biol.*, v. 33, n. 2, p.103-119, 2006.
- EMBRAPA. **Cultivo do Milho**. Disponível em: <[https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p\\_p\\_id=conteudoportlet\\_WAR\\_sistemasdeproducaolf6\\_1ga1ceportlet&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=normal&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column-1&p\\_p\\_col\\_count=1&p\\_r\\_p\\_-76293187\\_sistemaProducaoid=7905&p\\_r\\_p\\_-996514994\\_topicoid=8668](https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducaolf6_1ga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaoid=7905&p_r_p_-996514994_topicoid=8668)>. Acesso em: 28 julho. 2019.
- FURTADO, C. **Formação Econômica do Brasil**. 32ª Edição. Companhia Editora Nacional, São Paulo, Brasil, 2005.
- IOANNIDOU, O. et al. **Investigating the potential for energy, fuel, materials and chemicals production from corn residues (cobs and stalks) by non-catalytic and catalytic pyrolysis in two reactor configurations**. *Renewable And Sustainable Energy Reviews*, [s.l.], v. 13, n. 4, p.750-762, maio 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2008.01.004>.
- KSHIRSAGAR, S.d. et al. An isolated *Amycolatopsis* sp. **GDS for cellulase and xylanase production using agricultural waste biomass**. *Journal Of Applied Microbiology*, [s.l.], v. 120, n. 1, p.112-125, 9 dez. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12988>.
- KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O.V. **Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives**. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 35, n. 5, p.377-391, 2008.
- LIU, Kai et al. **High concentration ethanol production from corncob residues by fed-batch strategy**. *Bioresource Technology*, [s.l.], v. 101, n. 13, p.4952-4958, jul. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.013>.
- MATSUOKA, S. et al. **A EVOLUÇÃO DO PROÁLCOOL**. *Agroanalysis*, Rio de Janeiro, p.29-30, 2016.
- METREVELI, Eka et al. **Alteration of white-rot basidiomycetes cellulase and xylanase activities in the submerged co-cultivation and optimization of enzyme production by *Irpex lacteus* and *Schizophyllum commune***. *Bioresource Technology*, [s.l.], v. 241, p.652-660, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.148>.
- MILLER, G.L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar**. *Anal. Chem.*, v. 31, n. 3, p 426-428, 1959.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Setor sucroalcooleiro, 2019**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/agroenergia/producao>. Acesso em: julho/2019
- NITSCH, M.. **O programa de biocombustíveis Proalcool no contexto da estratégia energética brasileira**. *Rev. Econ. Polít.*, vol. 2, n. 2 (42), 1991.
- NOVACANA. **Processos de Fabricação de Etanol**. Disponível em: <https://www.novacana.com/etanol/fabricacao/>. Acesso em maio/2018
- OKUNO, F.M. **Desempenho econômico de um sistema de produção de biomassa da cana energia**. 2016. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Engenharia de Sistemas Agrícolas, Universidade de São Paulo – ESALQ, Piracicaba, 2016.
- OLSSON, Lisbeth et al. **Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30**. *Enzyme And Microbial Technology*, [s.l.], v. 33, n. 5, p.612-619, out. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0141-0229\(03\)00181-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0141-0229(03)00181-9).

Portal do Governo do Brasil. **Produção de milho impulsiona Safra 2018/2019, que deve alcançar 236,7 milhões de toneladas.** Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/noticias/economia-e-financas/2019/05-1/producao-de-milho-impulsiona-safra-2018-2019-que-deve-alcancar-236-7-milhoes-de-toneladas>>. Acesso em: 27 julho 2019.

SALLES-FILHO, S.L.M. et al. **Perspectives for the Brazilian bioethanol sector: The innovation driver.** Energy Policy, v. 108, p.70-77, 2017.

SCARCELLA, A.S.A. **Hidrólise e fermentação de resíduos celulósicos visando a produção de etanol.** 2016. 140 f. Dissertação (Mestrado) - Bioquímica, Universidade de São Paulo - FMRP, Ribeirão Preto, 2016.

SHARMA, D. et al. Bioenerg. Res. (2018) 11: 219. <https://doi.org/10.1007/s12155-017-9890-z>

SILVA, J. C. R. et al. A. **Purification and biochemical characterization of glucose-cellobiose-tolerant cellulase from *Scytalidium thermophilum*.** Folia Microbiol., v. 58, p. 561-568, 2013.

SHIELDS, S.; BOOPATHY, R.. **Ethanol production from lignocellulosic biomass of energy cane.** Int. Biodeterior. Biodegradation, v. 65, n. 1, p.142-146, 2011.

SOCOL, C.R. et al. **Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil.** Bioresour. Technol., v. 101, n. 13, p. 4820-4825, 2010.

TEW, T., COBILL, R., 2008. **Genetic improvement of sugarcane (*Saccharum spp.*) as an energy crop.** In: Vermerris, W. (Ed.), Genetic improvement of bioenergy crops. Springer Science + Business Media, LLC Nova Iorque, NY, p. 249-272.

TOMÉ, J.A.T.R. **Desenvolvimento do pré-tratamento por explosão com vapor da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração via hidrólise enzimática.** 2014. 113 f. Dissertação (Mestrado) - Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2014.

UNICA. **Moagem de cana-de-açúcar e produção de açúcar e etanol - safra 2016/2017.** Disponível em:<http://unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php?idMn=32&tipoHistorico=4>. Acesso em: julho/2019

VILLELA, G.G.; BACILA, M. & TASTALDI, H. **Técnica e experimentos de bioquímica.** Ed. Guanabara Koogan, p. 523, 1973.

YUAN, S. F. et al. **Biochemical characterization and structural analysis of a bi-functional cellulose/xylanase from *Clostridium thermocellum*.** JBC, doi:10.1074/jbc.M114.604454, 2015.

XUE, Dongsheng et al. **Expression of a bifunctional cellulase with exoglucanase and endoglucanase activities to enhance the hydrolysis ability of cellulase from a marine *Aspergillus niger*.** Process Biochemistry, [s.l.], v. 52, p.115-122, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2016.09.030>.

## CARACTERIZAÇÃO DA GERAÇÃO DO SULFETO DE HIDROGÊNIO (H<sub>2</sub>S) EM TECIDOS DE CAMUNDONGOS COM SENESCÊNCIA ACELERADA (SAMP8)

Data de aceite: 01/07/2020

Data de submissão: 17/04/2020

**Simone Aparecida Teixeira**

<http://lattes.cnpq.br/8672766401462829>

**Gabriel Luciano Gomes**

<http://lattes.cnpq.br/9654680806141725>

**Leandro Rodrigues**

<http://lattes.cnpq.br/9769571504506255>

**Flávia Neto de Jesus**

<http://lattes.cnpq.br/8984221531868368>

**Antonio Garcia Soares**

<http://lattes.cnpq.br/4826808611963053>

**Anderson Romério Azevedo Cerqueira**

<http://lattes.cnpq.br/1913995514705157>

**Karla Barroso Feitosa**

<http://lattes.cnpq.br/1709774814695363>

**Karina Barbosa Alves**

<http://lattes.cnpq.br/4366859901631001>

**Larissa Regina Silva de Oliveira**

<http://lattes.cnpq.br/6033122655504136>

**Eliana Hiromi Akamine**

Universidade de São Paulo, Departamento de Farmacologia - São Paulo, SP

<http://lattes.cnpq.br/4942653438254719>

**Marcelo Nicolás Muscará**

<http://lattes.cnpq.br/6939849851265986>

**Soraia Kátia Pereira Costa**

<http://lattes.cnpq.br/5388297056642128>

Universidade de São Paulo, Departamento de Farmacologia - São Paulo, SP

**RESUMO:** O recente conhecimento das funções fisiológicas do novo mediador gasoso, o sulfeto de hidrogenio (H<sub>2</sub>S), vem revelando grande potencial terapêutico para moléculas doadoras de H<sub>2</sub>S em doenças inflamatórias e cardiovasculares. A ampla distribuição das enzimas cistationina-gama-liase (CSE), cistationina-beta-sintase (CBS) e 3-mercaptopiruvato sulfotransferase (3MST) envolvidas na síntese do H<sub>2</sub>S, faz desse gás uma molécula sinalizadora importante na regulação celular. Todavia, pouco se sabe sobre a participação do H<sub>2</sub>S no controle celular no processo de senescência. O objetivo deste estudo foi avaliar a geração de H<sub>2</sub>S e a expressão das enzimas CBS, CSE e 3MST em órgãos e tecidos de camundongos com senescência acelerada (SAMP8) e resistente à senescência (SAMR1), com 3 meses de idade. A produção de H<sub>2</sub>S avaliada pelo método do acetato de chumbo foi mensurada no encéfalo, hipotálamo, coração, pulmão, rim, fígado e pele. A expressão proteica das enzimas CSE, CBS e 3MST foi analisada por Western blotting. A geração de H<sub>2</sub>S mostrou-se significativamente maior no hipotálamo, coração e fígado dos animais SAMP8, mas não nos demais órgãos,

em comparação com os animais SAMR1. No hipotálamo dos camundongos SAMP8, a expressão da CBS foi significativamente maior, enquanto da CSE foi menor em relação ao SAMR1. Não foram observadas diferenças na expressão das três enzimas nos demais órgãos dos camundongos SAMP8 e SAMR1. A relação entre a geração de H<sub>2</sub>S e o envelhecimento revela que a concentração do H<sub>2</sub>S ocorre de forma distinta em diversos órgãos, sendo que no SNC, coração e fígado, mas não nos demais órgãos, a geração foi maior em relação ao SAMR1. A via enzimática CBS, mas não as demais, exerce maior influência na biossíntese do H<sub>2</sub>S, particularmente no hipotálamo de animais senis.

**PALAVRAS CHAVE:** Sulfeto de hidrogênio, envelhecimento, enzimas geradoras de H<sub>2</sub>S.

## CHARACTERIZATION OF HYDROGEN SULFIDE (H<sub>2</sub>S) GENERATION TISSUES FROM MICE WITH ACCELERATED SENESCENCE (SAMP8)

**ABSTRACT:** The recent knowledge of the physiological functions of the new gaseous transmitter, hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S), has revealed a great therapeutic potential for H<sub>2</sub>S donor molecules in inflammatory and cardiovascular diseases. The vast distribution of the enzymes cystathionine-gamma-lyase (CSE), cystathionine-beta-synthase (CBS) and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3MST) involved in H<sub>2</sub>S synthesis, making it an important signaling molecule. However, little is known about the role of H<sub>2</sub>S in cell control of the senescence process. The aim of this study was to evaluate the generation of H<sub>2</sub>S and the expression of CBS, CSE and 3MST in organs and tissues of mice with accelerated (SAMP8) and resistant to senescence (SAMR1), with 3 months of age. The production of H<sub>2</sub>S, assessed by the lead acetate method, was measured in the encephalus, hypothalamus, heart, lung, kidney, liver and skin. Protein expression of CSE, CBS and 3MST was analyzed by Western blotting. The generation of H<sub>2</sub>S was significantly higher in the hypothalamus, heart and liver, but not in the other organs from SAMP8 animals when compared to SAMR1. In the hypothalamus of SAMP8 mice, a marked expression of CBS was correlated with H<sub>2</sub>S production, while CSE was not as compared to SAMR1. There were no statistical differences in the expression of CBS, CSE and 3MST in the other tissues of SAMP8 and SAMR1 mice. The relationship between the generation of H<sub>2</sub>S and aging reveals that the concentration of H<sub>2</sub>S occurs differently in distinct several organs, being the H<sub>2</sub>S generation at the CNS, heart and liver, but not in the other organs, markedly higher compared to SAMR1. The CBS enzymatic pathway, but not CSE and 3MST, seems to play better role on H<sub>2</sub>S biosynthesis, particularly in the hypothalamus of senescent mice.

**KEYWORDS:** Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S), senescence, enzymes producing H<sub>2</sub>S.

## INTRODUÇÃO

Há pouco mais de uma década o conhecimento de importantes funções fisiológicas do sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), um novo membro da família de transmissores gasosos, como

o óxido nítrico (NO) e monóxido de carbono (CO), vem sendo acumulado e reconhecido em pesquisas clínica e experimental. Embora considerado por muito tempo como um gás poluente e tóxico, sua produção endógena foi caracterizada em meados dos anos 80 por Stipanuk & Beck (1982) e, em seguida, também sua importante função neuromoduladora foi elucidada (Abe & Kimura, 1996).

A ampla distribuição das enzimas cistationina-gama-liase (CSE), cistationina-beta-sintase (CBS) e 3-mercaptopiruvato sulfotransferase (3MST), envolvidas na síntese de H<sub>2</sub>S em diversas estruturas biológicas, evidencia a importância desse gás como molécula sinalizadora na regulação celular de diversas funções orgânicas em mamíferos. Na biossíntese do H<sub>2</sub>S, além das enzimas supracitadas, alguns substratos (metabólitos da L-cisteína, 3-mercaptopiruvato - 3MP) e co-fatores (5'fosfato piridoxal [vitamina B6]) são necessários. Ademais, vias não enzimáticas participam de pequena concentração da geração endógena de H<sub>2</sub>S, em particular, em reações de óxido-redução de proteínas e compostos contendo Fe-S, tais como ferredoxinas e proteínas de Rieske (Beinert, Holm & Munck, 1997), na redução do elemento enxofre por glutathiona (GSH), usando NAD e NADH da glicólise como doadores de elétrons (Searcy & Lee, 1998) e, do ânion tiosulfato, em reação envolvendo o piruvato como doador de hidrogênio (Kolluru, Shen, Bir, & Kevil, 2013).

Postula-se que as enzimas catalisadoras de H<sub>2</sub>S são expressas de forma variada nos sistemas biológicos; portanto, é de se esperar que alterações (excesso ou deficiência) na expressão de enzimas envolvidas na síntese ou metabolismo de H<sub>2</sub>S possam afetar a distribuição endógena do H<sub>2</sub>S e, conseqüentemente, possam promover ou agravar quadros patológicos, incluindo doenças cardiovasculares, inflamatórias, neurodegenerativas e infecciosas (Wang, 2012; Rodrigues et al., 2017; Xiao et al., 2018; Coavoy-Sanchez et al., 2020). Moléculas doadoras de H<sub>2</sub>S despontam na literatura como agentes promissores no controle de doenças inflamatórias e condições associadas a danos gerados por excesso de produção de estresse oxidativo, tais como na asma alérgica (Benetti et al., 2013; Campos et al., 2016; Wallace et al., 2018). Outras evidências do nosso grupo mostraram efeitos farmacológicos adicionais para moléculas doadoras de H<sub>2</sub>S de diferentes classes, incluindo ação antinociceptiva, antipruriginosa, anti-inflamatória e citoprotetora (Benetti et al, 2013; Ekundi-Valentin et al, 2013; Rodrigues et al, 2017; Coavoy-Sánchez et al., 2016; Costa et al., 2020).

Novas moléculas doadoras de H<sub>2</sub>S estão sendo testadas e outras estão disponíveis comercialmente como ferramentas farmacológicas, cujos perfis farmacocinético variam, desde compostos doadores de H<sub>2</sub>S de liberação lenta (GYY4137, SRHD e AP67), moléculas híbridas com um grupamento doador de H<sub>2</sub>S (1,2-ditioil-3-thiona, ou ADT-OH) inserido em uma molécula clássica de anti-inflamatório não-esteróide (AINE), como o ATB-346 (naproxeno), ATB-343 (indometacina), ATB-429 (mesalamina), ATB-337 (diclofenaco), ATB-340 (aspirina) e ATB-352 (cetoprofeno) (Herrera et al., 2015; Powell et al. 2018;

Szabo e Papapetropoulos, 2017).

Inúmeras contribuições experimentais e clínicas na literatura vêm centralizando no papel protetor do H<sub>2</sub>S em doenças cardiovasculares e inflamatórias; por outro lado, pouco se sabe sobre a correlação entre diferenças na geração do H<sub>2</sub>S e os benefícios na manutenção à saúde e, também, no envelhecimento. Nesse contexto, Jin e colegas (2015) demonstraram que a geração de H<sub>2</sub>S em tecido cardíaco de camundongos diabéticos senis foi reduzida quando comparada a concentração obtida no coração de camundongos senis não diabéticos. Tal efeito foi associado à menor expressão cardíaca das enzimas CSE e 3-MST, sugerindo um possível envolvimento desse achado no desenvolvimento da diabetes (Jin et al., 2015). Mais recentemente, um grupo de evidências compiladas em revisão de Mun e colaboradores (2019) apoiam fortemente a sugestão de que níveis distintos de H<sub>2</sub>S têm direta influência e correlação com as potenciais alterações cerebrovasculares no processo de envelhecimento. Isto sugere um potencial terapêutico para o H<sub>2</sub>S nas alterações cerebrovasculares no envelhecimento. Além disto, linhas de evidência *in vitro* mostram o envolvimento do H<sub>2</sub>S na senescência celular e orgânica. Em cultura de células endoteliais de veia umbilical humana, o tratamento desta cultura com o doador espontâneo de H<sub>2</sub>S, o NaHS, protegeu as células endoteliais contra a senescência celular, por meio de mecanismo relacionado a atividade da sirtuina 1 (SIRT1; Suo et al., 2013), enzima que regula diversos aspectos fisiológicos do organismo como diferenciação, sobrevivência, efeitos neuroprotetores e metabolismo celular (Anastasiou e Krok, 2006). O H<sub>2</sub>S protege contra a senescência celular induzida pelo estresse. Outro estudo em cultura de fibroblastos mostrou que o H<sub>2</sub>S protegeu contra a senescência celular via sulfidação da proteína 1 associada à ECH do tipo Kelch (Keap1) e ativação do fator 2 relacionado ao fator nuclear eritróide 2 (Nrf2; Yang et al., 2013). O H<sub>2</sub>S também inibe a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) mitocondrial via sulfidação do resíduo Cys-59 da proteína adaptadora da sinalização (Shc), o que, por sua vez, impede a fosforilação do p66Shc, um ativador da sinalização redox mitocondrial (Xie et al., 2014). A proteção do H<sub>2</sub>S contra a senescência em cultura de células foi também demonstrada pela capacidade desse gás promover S-sulfidação da proteína quinase cinase 1 ativada por mitogênio (MEK1), levando à ativação da poli [ADP-ribose] polimerase 1 (PARP-1) e ao reparo do dano ao DNA (Pan et al., 2014).

Apesar dessas evidências, não existe ainda uma relação bem estabelecida entre a geração de H<sub>2</sub>S (e/ou da expressão das enzimas produtoras) em diferentes estruturas biológicas e a sua caracterização no processo de envelhecimento e / ou nas doenças associadas ao envelhecimento.

Em todas as espécies, a perda progressiva de funções fisiológicas é uma consequência inevitável do envelhecimento (Wang et al., 2012). Alguns sinais clássicos visíveis do envelhecimento incluem a perda de cabelo, da audição e visão. Além disto, surge a incapacidade ou a redução na capacidade de reprodução, perda ou prejuízo

cognitivo e deficiência imunológicas que, em conjunto, contribuem para uma baixa qualidade de vida no idoso. Está bem estabelecido que tais ocorrências são resultantes de lesões celulares, que comprometem a função tissular como um todo, associados ainda aos distúrbios bioquímicos e moleculares (Gems e Partridge, 2013).

Postula-se que, pelo menos, nove características do envelhecimento são necessárias para determinar o fenótipo dessa condição. Estas são baseadas em características comuns e a contribuição destas para o envelhecimento. As características primárias do envelhecimento compreendem fenômenos enquadrados como causas primordiais de danos celulares, que se acumulam com o passar do tempo, tais como: instabilidade genômica, atrito de telômeros, alterações epigenéticas e a perda de proteostase (vias biológicas que controlam a biogênese e outras funções celulares). Como consequência, outras características (antagônicas) do envelhecimento se contrapõem aos aspectos primários na tentativa de atenuar o dano celular, mas eventualmente podem se tornar prejudiciais: desregulação de detecção de nutrientes, disfunção mitocondrial e senescência celular. Por fim, características integrativas são estabelecidas, quando os mecanismos de homeostasia tissular não podem mais compensar os danos causados pelas etapas anteriores. Estabelecem-se então a exaustão de células-tronco e alterações nas comunicações intercelulares López-Ótin et al., 2013; Perridon et al., 2016).

Em meados dos anos 70 um modelo animal de senescência acelerada foi observado numa linhagem de camundongos AKR/J, posteriormente denominados senescence-prone inbred strains (SAMP), revelado por Takeda e colaboradores na universidade de Kyoto (para revisão, vide Pallas, 2012). Os pesquisadores observaram que, após várias ninhadas nos casais de camundongos AKR/J, alguns animais nas diferentes ninhadas apresentaram sinais característicos de envelhecimento, incluindo perda de peso, de cabelo, lordose ou cifose, perda de atividade e redução na expectativa de vida. Após triagem e futuro acasalamento entre pares semelhantes, estabeleceu-se uma nova linhagem com fenótipo propenso a senescência acelerada (SAMP, ~9,7 meses). Filhotes da mesma ninhada que não mostraram fenótipos de senescência acelerada foram também isolados e mantidos para uma estirpe resistente à senescência acelerada (SAMR, ~16,3 meses).

Como resultado, foram caracterizados 9 subgrupos para SAMP e 3 para SAMR com diferentes fenótipos de anormalidades. A cepa SAMP8 juntamente com sua cepa resistente SAMR1 vem sendo largamente estudada como modelo experimental para doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, cujos resultados experimentais revelaram diferenças significativas em marcadores do estresse oxidativo (Petursdottir et al, 2007; Song et al, 2011) e de enzimas antioxidantes (Sureda et al, 2006; Bayram et al, 2013) entre os animais SAMP8 E SAMR1. Por outro lado, até o presente momento a participação do H<sub>2</sub>S e a expressão de enzimas envolvidas na síntese desse gás não foram ainda descritos nessa linhagem.

No intuito de aprofundar o conhecimento sobre a relevância do H<sub>2</sub>S na evolução da

senescência, particularmente em órgãos periféricos (por exemplo: encéfalo, hipotálamo, coração, pulmão, rim, fígado e pele), este estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a geração de H<sub>2</sub>S nesses tecidos, bem como a expressão proteica de enzimas envolvidas na sua geração (CBS, CSE e 3MST) em camundongos SAMP8 e SAMR1, com 3 meses de idade.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Animais:** Casais de camundongos SAMR1 (resistentes à senescência) e SAMP8 (com senescência acelerada) foram previamente obtidos do Biotério no Parc Cientific (Barcelona, Espanha) e, depois, futuras ninhadas foram produzidas e mantidas no Biotério do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo. Foram utilizados animais SAMP8 e SAMR1 machos com 3 meses de idade. Os animais foram submetidos à eutanásia sob anestesia inalatória profunda com isoflurano (3-5%) em O<sub>2</sub>, sob aprovação do Comitê de Ética no uso de animais do ICB/USP (CEUA, ICB / USP; no 67/2017). Diversos tecidos e órgãos (encéfalo, hipotálamo, coração, pulmão, fígado, rim e pele) foram retirados, congelados em N<sub>2</sub> líquido e mantidos a -80°C até processamento das amostras.

**Quantificação da produção de H<sub>2</sub>S em tecidos:** O método de quantificação da geração de H<sub>2</sub>S foi baseado na formação de sulfeto de chumbo, conforme adaptado com modificações (Hine et al. 2015; Rodrigues et al., 2017). Para isto, as amostras de tecidos foram pesadas e homogeneizadas em tampão fosfato (100 mM, pH 7,4), contendo o inibidor de proteases fenil-metil-sulfonil-fluoreto (PMSF 1mM), na proporção 1:10 (1 g de tecido para 10 ml de tampão). O homogenato obtido foi centrifugado (10.000 g; 10 min, 4 °C) e o sobrenadante foi coletado para as dosagens subsequentes. Uma curva padrão de hidrosulfeto de sódio (NaHS; 1,95 a 500 µM) foi preparada a partir de uma solução estoque em tampão fosfato (2 mM), mantidas sempre em gelo. A reação foi preparada em microplaca, pipetando-se 200 µl das amostras (equivalente a 200 - 400 µg de proteínas), e volumes conhecidos do substrato L-cisteína 200 mM (12,5 µl), co-fator 5' fosfato de pirodoxal 40mM (12,5 µl) e de tampão fosfato (25 µl). Por último, o volume de 250 µl da curva padrão foi adicionado e, em seguida, o papel filtro impregnado com acetato de chumbo foi colocado sobre a fase líquida e incubado a 37°C durante 2 horas. O papel filtro contendo o resultado da reação foi fotografado em fotodocumentador (ChemiDoc Image System, Bio Rad, EUA) e, em seguida, as fotografias foram analisadas por meio de análise densitométrica com o auxílio do programa ImageLab (Bio Rad, EUA). Os resultados obtidos foram expressos como quantidade de H<sub>2</sub>S gerado por minuto por miligrama de proteínas. Ressalta-se que a reação obtida e visualizada no papel filtro, resulta da interação do H<sub>2</sub>S produzido pelas amostras com o acetato de chumbo impregnado no papel filtro, que culmina numa coloração escurecida do precipitado de sulfeto de chumbo.

**Avaliação de expressão protéica das enzimas CBS, CSE e 3MST por Western Blot:** Os tecidos foram homogeneizados em 5 volumes de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 contendo 1 mM de PMSF e coquetel de inibidores de protease (Sigma Chem Co, EUA). Em seguida os homogenatos foram centrifugados a 10.000 *g*, durante 10 minutos e os sobrenadantes foram submetidos a análise de proteínas, de acordo (Bradford, 1977). As amostras foram diluídas em tampão de Laemmli e fervidas em banho-maria por 5 min. Em seguida, as proteínas presentes nas amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo lauril sulfato de sódio (SDS-PAGE 10%), conforme originalmente descrito por Laemmli (1970). Durante a eletroforese foi utilizado tampão contendo Tris (25 mM), glicina (192 mM) e SDS (0,1%), e aplicada uma amperagem constante de 35 mA durante 2 horas. Posteriormente, as bandas proteicas foram transferidas por eletroforese em sistema submerso para uma membrana de nitrocelulose (200 mA, ~65 V; 1,5 horas). Durante a transferência foi utilizado tampão contendo 25 mM de Tris, 192 mM de glicina, 0,1% de SDS e 18% (V/V) de etanol absoluto. A eficiência da transferência foi verificada pela coloração das membranas por vermelho de Ponceau (0,1% em ácido acético a 5%). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação da mesma com a solução de albumina de soro bovino (BSA 3%) em TBS-t (20 mM de Tris-HCl, 137 mM de NaCl, pH 7,4, contendo 0,1% de Tween-20). As membranas foram incubadas com anticorpos primários específicos anti-CBS (monoclonal camundongo, Abnova, EUA), CSE (policlonal coelho, Proteintech, EUA) e 3MST (policlonal coelho, Abnova, EUA). Após uma série de 6 lavagens (6x 10 min) com TBS-t, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase de cavalo (HRP). Após nova série de lavagens, as bandas imunorreativas foram reveladas mediante um kit de quimioluminescência do tipo ECL em fotodocumentador. As bandas foram analisadas por densitometria e normalizadas pela densitometria das respectivas linhas (*lanes*) com coloração Ponceau. Os resultados das razões foram expressos em unidades arbitrárias (U.A).

### **Análise estatística**

Todos os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. As diferenças entre as médias dos grupos de animais foram analisadas pelo teste *t*-Student para amostras não pareadas. Diferenças com valores de  $P < 0,05$  foram consideradas significativas.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Geração de H<sub>2</sub>S em órgãos e tecidos de camundongos SAMR1 e SAMP8**

De acordo com a Figura 1, a geração de H<sub>2</sub>S no hipotálamo, coração e fígado de camundongos SAMP8, com 3 meses de idade, foi significativamente maior quando comparada ao respectivo grupo controle (SAMR1), indicando que, pelo menos na linhagem SAMP8 com 3 meses de vida, a produção de H<sub>2</sub>S não está negativamente associada a senescência nessas estruturas. Ao contrário, geração de H<sub>2</sub>S no encéfalo, pele, pulmão e

rins dos mesmos camundongos SAMP8 não foi estatisticamente diferente do respectivo grupo SAMR1.

Vale ressaltar que dentre os tecidos analisados, a geração de  $H_2S$  foi muito superior no fígado dos animais, enquanto o pulmão exibiu a menor geração desse gás.

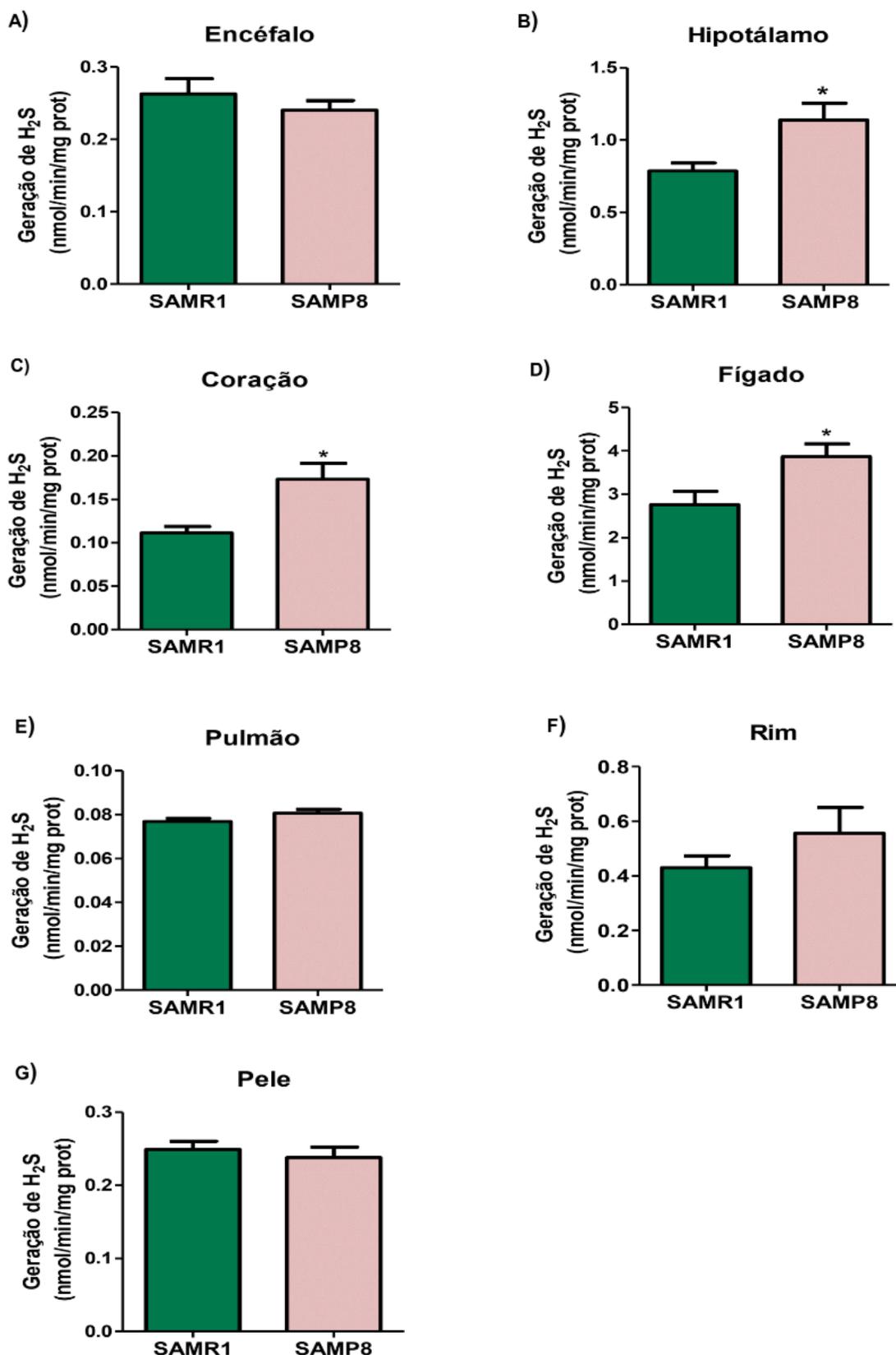


Figura 1. Geração de  $H_2S$  em amostras de A) encéfalo, B) hipotálamo, C) coração, D) fígado, E) pulmão, F) rim e G) pele de camundongos SAMR1 (n=6 -10) e SAMP8 (n= 7 - 11) com 3 meses de idade. *t*-test (\*:  $P < 0,05$ ).

Curiosamente, de acordo com Giuliani et al. (2013), o encéfalo de animais SAMP8, a partir dos primeiros meses de vida já apresenta significativo estresse oxidativo, o que por sua vez, deve atuar diretamente na biogênese do H<sub>2</sub>S. Nossos resultados, ao contrário, revelaram concentrações elevadas em diversos tecidos e, pelo menos nos animais com 3 meses de vida, nenhuma alteração significativa no encéfalo total, muito embora, produção elevada de H<sub>2</sub>S foi observada no hipotálamo. Recentemente, dados de Chen e colaboradores (2019) demonstraram que o tratamento de animais com doadores de H<sub>2</sub>S foi capaz de reduzir a disfunção cognitiva frente ao aumento da concentração do fator pró-envelhecimento sistêmico, β2-microglobulina, no hipocampo, o qual regula negativamente a função cognitiva.

### **Expressão das enzimas geradoras de H<sub>2</sub>S**

No intuito de averiguar a correlação entre a geração aumentada de H<sub>2</sub>S e as enzimas envolvidas, as análises de expressão proteica foram realizadas por Western blot somente nos tecidos cuja produção desse gás foi estatisticamente diferente do grupo controle SAMR1.

Vale acrescentar que a síntese de H<sub>2</sub>S ocorre majoritariamente pela via enzimática da CBS, cuja expressão maior ocorre no SNC (hipocampo, cerebelo, córtex e tronco cerebral; Powell et al. 2017), enquanto a expressão da CSE é mais comum em tecidos periféricos, tais como aorta, artéria mesentérica, veia porta, pulmão, pâncreas, estômago, fígado e rim. Mais recentemente, revelou-se que a 3MST é mais expressa em órgãos periféricos, como fígado, rins, coração, pulmão, testículo e aorta (Powell et al. 2017).

Neste estudo, identificamos que no hipotálamo de animais SAMP8, com 3 meses de vida, a expressão da CBS mostrou-se significativamente maior em relação ao respectivo grupo controle (SAMR1), enquanto a expressão da enzima CSE revelou-se estatisticamente menor nos animais SAMP8 em relação ao seu controle (Figura 2). Por outro lado, vale ressaltar que a maior produção do H<sub>2</sub>S no hipotálamo dos animais está diretamente associada a maior expressão da CBS nos animais SAMP8, sugerindo que essa enzima seja a responsável pela biossíntese de H<sub>2</sub>S nesses animais. A expressão da enzima 3-MST nesses tecidos não se mostrou significativamente diferente entre os grupos.

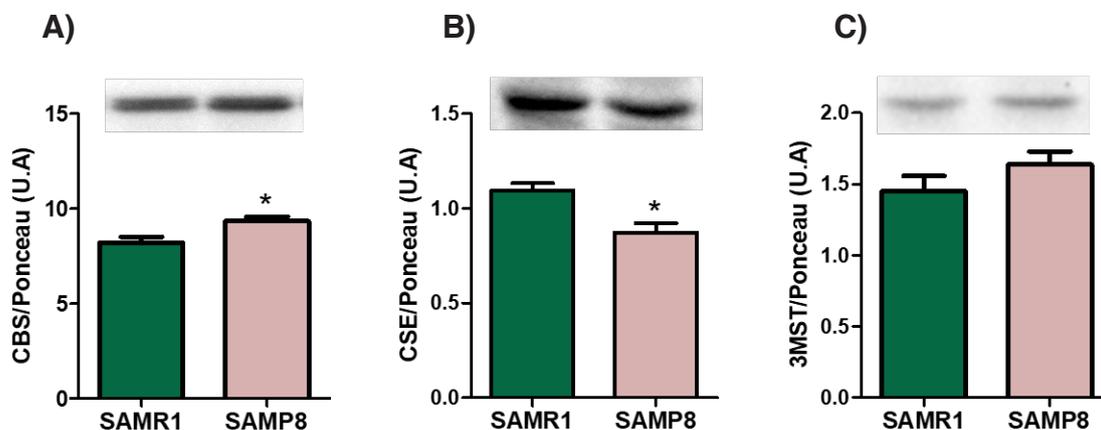


Figura 2: Western blot representativo para as enzimas A) CBS e B) CSE e C) 3MST em amostras de hipotálamo de camundongos SAMR1 (n=03) e SAMP8 (n=03) com 3 meses de idade. *t*-test (\*:  $P < 0,05$ ).

Curiosamente, no coração e fígado, tecidos estes que mostraram elevada geração de  $H_2S$  nos animais SAMP8, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de animais quanto à expressão proteica de CBS, CSE ou 3MST.

## CONCLUSÃO

O envelhecimento de tecidos, tais como, hipotálamo, fígado e coração é acompanhado de um aumento da produção de  $H_2S$  endógeno. Com exceção do aumento de expressão proteica de CBS no hipotálamo, esse fato não está relacionado com o aumento da expressão proteica das enzimas geradoras de sulfeto. Diferentes períodos de idade e outras vias (não enzimáticas) podem estar envolvidas e devem ser explorados.

## REFERÊNCIAS

- ABE K, KIMURA H. **The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator.** *J Neurosci*, 16 (3): 1066-1071, 1996.
- ANASTAIU D, KREK W. **SIRT1: linking adaptive cellular responses to aging-associated changes in organismal physiology.** *Physiology (Bethesda)*. 21, 404-410, 2006.
- BAYRAM B, NIKOLAI S, HUEBBE P et al. **Biomarkers of oxidative stress, antioxidant defence and inflammation are altered in the senescence-accelerated mouse prone 8.** *Age*, 35 (4), 1205-1217, 2013
- BEINERT H, HOLM RH & MÜNCK E. **Iron - sulfur clusters: Nature's modular, multipurpose structures.** *SCIENCE*, 277 (5326), 653 – 659, 1997.
- BENETTI LR, CAMPOS D, GURGUEIRA SA, VERCESI AE et al. **Hydrogen sulfide inhibits oxidative stress in lungs from allergic mice in vivo.** *Eur J Pharmacol*, 698 (1-3): 463-469, 2013.
- BRADFORD M. **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem*, 72: 248-254, 1976.

- CHEN SM, YI Y, ZENG D, TANG Y et al. **Hydrogen sulfide attenuates  $\beta$ 2-microglobulin-induced cognitive dysfunction: involving recovery of hippocampal autophagic flux.** *Front Behav Neurosci*, 13, 244, eCollection 2019.
- CAMPOS D, RAVAGNANI F, GURGUEIRA S et al. **Increased glutathione levels contribute to the beneficial effects of hydrogen sulfide and inducible nitric oxide inhibition in allergic lung inflammation.** *International immunopharmacology*. 39: 57-62, 2016.
- COAVOY-SÁNCHEZ S, RODRIGUES L, TEIXEIRA SA, SOARES A et al. **Hydrogen sulfide donors alleviate itch secondary to the activation of type-2 protease activated receptors (PAR-2) in mice.** *Pharmacol Res*. 113 (PtA): 686-694, 2016.
- COAVOY-SÁNCHEZ SA, COSTA SK, MUSCARÁ MN. **Review: Hydrogen sulfide and dermatological diseases.** *Br J Pharmacol*, 177 (4), 857-865, 2020.
- COSTA SK, MUSCARÁ MN, ALLAIN T, DALLAZEN J et al. **Enhanced analgesic effects and gastrointestinal safety of a novel, hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drug (ATB-352): A role for endogenous cannabinoids.** *Antioxid Redox Signal*. Online ahead of print, 2020.
- EKUNDI-VALENTIM E, MESQUITA FP, SANTOS KT et al. **A comparative study on the anti-inflammatory effects of single oral doses of naproxen and its hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S)-releasing derivative ATB-346 in rats with carrageenan-induced synovitis.** *Med Gas Res*, 16; 3(1): 24, 2013. doi: 10.1186/2045-9912-3-24.
- GEMS D, PARTRIDGE L. **Genetics of longevity in model organisms: debates and paradigm shifts.** *Annu Rev Physiol*, 75:621–644, 2013.
- GIULIANI D, OTTANI A, ZAFFE D et al. **Hydrogen sulfide slows down progression of experimental Alzheimer's disease by targeting multiple pathophysiological mechanisms.** *Neurobiol Learn Mem*, 104: 82–91, 2013.
- HERRERA BS, COIMBRA LS, DA SILVA AR, TEIXEIRA SA, COSTA SK, WALLACE JL, SPOLIDORIO LC, MUSCARA MN. **The H<sub>2</sub>S-releasing naproxen derivative, ATB-346, inhibits alveolar bone loss and inflammation in rats with ligature-induced periodontitis.** *Med Gas Res*, 5:4, eCollection 2015.
- HINE C, HARPUTLUGIL E, ZHANG Y et al. **Endogenous hydrogen sulfide production is essential for dietary restriction benefits.** *Cell*, 160 (1-2): 132-144, 2015.
- JIN S, PU S, HOU C, MA F et al. **Cardiac H<sub>2</sub>S generation is reduced in ageing diabetic mice.** *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 758358 2015.
- KOLLURU GK, SHEN X, BIR SC, KEVIL CG. **Hydrogen sulfide chemical biology: Pathophysiological roles and detection.** *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 35, 5-20, 2013.
- LAEMMLI UK. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature*, 227 (5259): 680-685, 1970.
- LÓPEZ-ÓTIN C, BLASCO M, PARTRIDGE L, SERRANO M, KROEMER G. **The hallmarks of aging.** *Cell*, 153: 1194–1217, 2013.
- MUN J, KANG M, JUNG J, PARK C. **Role of hydrogen sulfide in cerebrovascular alteration during aging.** *Arch Pharm Res*, 42 (5), 446-454, 2019.
- PALLAS M. **Review article: Senescence-accelerated mice P8: a tool to study brain aging and alzheimer's disease in a mouse model.** *International Scholarly Research Network*, 2012, Open access, doi:10.5402/2012/917167.

- PAN Y, YE S, YUAN D et al. **Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S)/cystathionine γ-lyase (CSE) pathway contributes to the proliferation of hepatoma cells.** *Mutat Res*, 763-764: 10–18, 2014.
- PERRIDON BW, LEUVENINK HGD, HILLEBRANDS JL et al. **The role of hydrogen sulfide in aging and age-related pathologies.** *Aging*. 8 (10), 2264-2289, 2016.
- PETURSDOTTIR AL, FARR SA, MORLEY JE, BANKS WA, SKULADOTTIR GV. **Lipid peroxidation in brain during aging in the senescence-accelerated mouse (SAM).** *Neurobiology of Aging*, 28 (8), 1170–1178, 2007.
- POWELL CR, DILLON KM, MATSON JB. **A review of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) donors: Chemistry and potential therapeutic applications.** *Biochem Pharmacol*, 149: 110-123, 2018.
- RODRIGUES L, EKUNDI-VALENTIM E, FLORENZANO J et al. **Protective effects of exogenous and endogenous hydrogen sulfide in mast cell-mediated pruritus and cutaneous acute inflammation in mice.** *Pharmacol Res*, 115: 255-66, 2017.
- SEARCY DG, LEE SH. **Sulfur reduction by human erythrocytes.** *The Journal of Experimental Zoology*, 282 (3), 310–322, 1998.
- SONG XN, ZHANG LQ, LIU DG et al. **Oxidative damage to RNA and expression patterns of MTH1 in the hippocampi of senescence-accelerated SAMP8 mice and Alzheimer's disease patients.** *Neurochemical Research*, 36 (8), 1558-1565, 2011.
- STIPANUK MH, BECK PW. **Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat.** *Biochem J*, 206 (2): 267-77, 1982.
- SUO R, ZHAO Z, TANG Z et al. **Hydrogen sulfide prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced senescence in human hmbilical vein endothelial cells through SIRT1 activation.** *Mol Med Rep*, 7 (6): 1865–70, 2013.
- SUREDA FX, GUTIERREZ-CUESTA J, ROMEU M et al. **Changes in oxidative stress parameters and neurodegeneration markers in the brain of the senescence-accelerated mice SAMP-8.** *Experimental Gerontology*, 41 (4), 360-367, 2006.
- SZABO C, PAPAPETROPOULOSA. **International union of basic and clinical pharmacology. CII: Pharmacological Modulation of H<sub>2</sub>S Levels: H<sub>2</sub>S Donors and H<sub>2</sub>S Biosynthesis Inhibitors.** *Pharmacol Rev*, 69 (4), 497-564, 2017.
- TAKEDA T, HOSOKAWA M, TAKESHITA S et al. **A new murine model of accelerated senescence.** *Mechanisms of Ageing and Development*, 17: 183-194, 1981.
- WALLACE JL, VAUGHAN D, DICAY M, MACNAUGHTON WK, DE NUCCI G. **Hydrogen sulfide-releasing therapeutics: translation to the clinic.** *Antioxid Redox Signal*, 28(16): 1533-1540, 2018.
- WANG R. **Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed.** *Physiol Rev*, 92 (2): 791-896, 2012.
- XIAO Q, YING J, XIANG L, ZHANG C. **THE BIOLOGIC EFFECT OF HYDROGEN SULFIDE AND ITS FUNCTION IN VARIOUS DISEASES.** *Medicine*, 97 (44):e13065, 2018.
- XIE ZZ, SHI M, XIE L et al. **Sulfhydration of p66Shc at cysteine59 mediates the antioxidant effect of hydrogen sulfide.** *Antioxid Redox Signal*, 21:2531–2542, 2014.
- YANG G, ZHAO K, JU Y et al., **Hydrogen sulfide protects against cellular senescence via S-sulfhydration of Keap1 and activation of Nrf2.** *Antioxidants & Redox Signaling*, 18 (15), 1906-1919, 2013.

## UTILIZAÇÃO DE POLPA DE ABACATE NA PRODUÇÃO DE BIOTENSOATIVO POR *Bacillus cereus*

Data de aceite: 01/07/2020

Data de submissão: 18/04/2020

### **Sumária Sousa e Silva**

Universidade do Estado de Mato Grosso  
(UNEMAT), Faculdade de Arquitetura e  
Engenharias  
Barra do Bugres- MT  
<http://lattes.cnpq.br/9221384636856458>

### **Viviany Martins Bento**

Universidade do Estado de Mato Grosso  
(UNEMAT), Faculdade de Arquitetura e  
Engenharias  
Barra do Bugres- MT  
<http://lattes.cnpq.br/1182605942909840>

### **Lainy Waleska de Brito Sodré**

Universidade do Estado de Mato Grosso  
(UNEMAT), Faculdade de Arquitetura e  
Engenharias  
Barra do Bugres- MT  
<http://lattes.cnpq.br/3139069749291621>

### **José Wilson Pires Carvalho**

Universidade do Estado de Mato Grosso  
(UNEMAT), Faculdade de Arquitetura e  
Engenharias  
Barra do Bugres- MT  
<http://lattes.cnpq.br/2176774421270422>

### **Sumaya Ferreira Guedes**

Universidade do Estado de Mato Grosso  
(UNEMAT), Faculdade de Ciências Sociais  
Aplicadas e Agrárias  
Nova Mutum - MT

<http://lattes.cnpq.br/8709866585453750>

### **Raquel Aparecida Loss**

Universidade do Estado de Mato Grosso  
(UNEMAT), Faculdade de Arquitetura e  
Engenharias  
Barra do Bugres- MT

<http://lattes.cnpq.br/3925129970802016>

**RESUMO:** Os biosurfatantes ou biotensoativos são moléculas anfipáticas produzidas por diferentes microrganismos. Apresentam como principal característica a capacidade de diminuir as tensões interfaciais e superficiais. Além disso, possuem algumas vantagens em relação aos surfatantes sintéticos, como: baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, resistência a altas temperaturas, concentrações de sal e variações de pH. Levando em consideração o desenvolvimento tecnológico e a necessidade de redução de custos, o uso da polpa de abacate como substrato de origem renovável assegura o baixo custo na produção do biodetergente. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi produzir biotensoativo por *Bacillus cereus*,

pelo processo de fermentação submersa utilizando como fonte de carbono a polpa de abacate. A fermentação foi realizada em modo batelada, a 30°C e 200 rpm de agitação, sendo que as condições de pH e concentração da fonte de carbono variaram conforme planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup>, com as respostas expressas em termos de redução de tensão superficial. As análises físico-químicas da polpa de abacate *in natura*, da variedade brenda apresentou 86,37±0,2% de umidade, 1,30±0,1% de acidez e pH de 6,82±0,2. Quanto a produção de biotensoativo, as menores tensões superficiais foram observadas após 24 horas de fermentação (0,036 N/m). E as condições que melhor favoreceram a produção do biotensoativo foi 3,0% de substrato e pH 7,0. Portanto, os resultados mostraram que polpa de abacate é um potencial substrato na produção de biotensoativo utilizando *Bacillus cereus*.  
**PALAVRAS-CHAVE:** Fermentação submersa, Tensão superficial, método do peso da gota.

#### USE OF AVOCADO PULP IN THE PRODUCTION OF BIOTENSOACTIVE BY *Bacillus cereus*

**ABSTRACT:** Biosurfactants or biotensoactives are amphipathic molecules produced by different microorganisms. Their main feature is the ability to reduce interfacial and surface tensions. In addition, they have some advantages in relation to synthetic surfactants, such as: low toxicity, high biodegradability, resistance to high temperatures, salt concentrations and pH variations. Taking into account technological development and the need to reduce costs, the use of avocado pulp as a substrate of renewable origin ensures the low cost in the production of biodetergent. Thus, the objective of the present work was to produce biotensoactive by *Bacillus cereus*, by the process of submerged fermentation using avocado pulp as a carbon source. The fermentation was carried out in batch mode, at 30°C and 200 rpm of agitation, and the conditions of pH and concentration of the carbon source varied according to complete factorial planning 2<sup>2</sup>, with the responses expressed in terms of reduction of surface tension. The physicalchemical analyzes of the raw avocado pulp, of the brenda variety, showed 86.37 ± 0.2% moisture, 1.30 ± 0.1% acidity and pH of 6.82 ± 0.2. As for the production of biotensoactive, the lowest surface tensions were observed after 24 hours of fermentation (0.036 N/m). And the conditions that best favored the production of the biotensoactive were 3.0% of substrate and pH 7.0. Therefore, the results showed that avocado pulp is a potential substrate in the production of biotensoactive using *Bacillus cereus*.

**KEYWORDS:** Submerged fermentation, Surface tension, Drop weight method.

## 1 | INTRODUÇÃO

Os tensoativos ou surfatantes são moléculas anfipáticas, ou seja, apresentam porções hidrofílicas e hidrofóbicas ao longo de sua estrutura. A porção polar pode ser constantemente anfotérica, iônica ou não-iônica, enquanto a porção apolar é formada por uma cadeia hidrocarbonada. Essas características permitem que essas moléculas atuem como agentes de superfície, diminuindo a tensão superficial e interfacial de duas fases

fluidas que não se misturam (ROVINA, EHRHARDT e TAMBOURGI, 2018; SANTOS et al., 2016).

Os biotensoativos são compostos produzidos por microrganismos, tais como: fungos, bactérias e leveduras. Além disso, os biotensoativos apresentam característica anfipática, com ação detergente, capacidade espumante, lubrificação, solubilização, dispersão de fases e emulsificantes (BUENO, SILVA e GARCIA-CRUZ, 2010; NITSCHKE e SILVA, 2018). Esses biocompostos possuem uma maior aceitação ecológica, pois são biodegradáveis, e apresentam baixa toxicidade. Além disso, podem ser produzidos a partir de matérias-primas renováveis e de baixo custo, o que os tornam excelentes substitutos em relação aos surfatantes sintéticos (NITSCHKE e PASTORE, 2002; BUENO, SILVA e GARCIA-CRUZ, 2010).

Atualmente, os biotensoativos representam 10 % da produção mundial de surfatantes, o que equivale a aproximadamente 10 milhões de toneladas por ano. Em geral são utilizados em alimentos (produção de emulsificantes alimentícios, tratamento de superfícies, agentes antimicrobianos), em produtos farmacêuticos (formulação de medicamentos, cremes), na agricultura (produção de fertilizantes, biocontrole de pragas), na engenharia civil (tratamento de restos materiais e esgoto) bem como em outras indústrias (NITSCHKE e SILVA, 2018; SANTOS et al., 2016).

No entanto, os biotensoativos ainda não conseguem competir economicamente no mercado com os compostos sintéticos químicos, devido aos elevados custos e baixos rendimentos de produção. Isso se deve a baixa eficiência da metodologia de bioprocessamento, baixa produtividade das cepas microbianas e da utilização de substratos de alto custo (ARAUJO, FREIRE e NITSCHKE, 2013; HABA, SPUNY e BUSQUETS, 2000). Estima-se que os substratos representem de 10 a 30% do custo total de grande parte dos processos biotecnológicos (MUTHUSAMY et al., 2008). A aplicação de substratos de baixo valor econômico é uma das formas de reduzir o custo final na produção desses metabólitos microbianos.

Os substratos são fontes de nutrientes importantes que influenciam significativamente na produção de biotensoativos, uma vez são ricos em carbono, nitrogênio, fosfatos, íons metálicos e outros componentes. Os mais adequados para o crescimento microbiano são aqueles ricos em carboidratos ou lipídios, com uma relação equilibrada de carbono e nitrogênio, e altas concentrações de micronutrientes importantes para o metabolismo microbiano (ROVINA, EHRHARDT e TAMBOURGI, 2018).

O abacate (*Persea americana* Mill.) é um fruto climatérico, ou seja, seu amadurecimento ocorre após a colheita (FIGUEIREDO NETO et al., 2015). Sua polpa, um potencial substrato na produção de biotensoativo, basicamente constituída por ácidos graxos não saturados e água é cremosa de sabor suave, e coloração verde-amarelada. Além disso, sua polpa apresenta notável qualidade nutricional, pois contém grande quantidade de vitaminas, minerais, proteínas e fibras, além de elevado teor de lipídios. Contém ainda

níveis elevados de compostos fitoquímicos bioativos, incluindo carotenoides, esteróis, compostos fenólicos, entre outros (DAIUTO et al., 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Atualmente são conhecidos mais de 500 tipos de abacates, dentre eles destacam-se as variedades: avocado (hass), brenda, fortuna, reed, bacon, tropical, fucks, geada, margarida, ouro verde e quintal (CENTRO DE QUALIDADE EM HORTICULTURA-CEAGESP, 2015). Os principais produtores e exportadores de abacate distribuem-se entre os países da África e da América do Sul e Central, além de Israel, Espanha e Estados Unidos (DAIUTO et al., 2010). No Brasil, a produção mais expressiva encontra-se na região sul e sudeste, especificamente nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná (FIGUEIREDO NETO et al., 2015). E a variedade mais popular é a brenda, cultivar utilizada no presente trabalho.

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi produzir biotensoativo, pelo processo de fermentação submersa utilizando o microrganismo *Bacillus cereus*, e como fonte de carbono a polpa de abacate.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Análises físico-químicas da polpa de abacate

Os frutos selecionados como objeto deste estudo foram da variedade Brenda, adquiridos no supermercado local da cidade de Barra do Bugres, Mato Grosso, Brasil. Os frutos foram adquiridos em estágio maduro e transportados para o Laboratório de matérias-primas para produção de biodiesel (LMPPB), onde foram selecionados e sanitizados em água corrente abundante para posterior avaliação da polpa e posterior utilização na produção de biotensoativos.

As análises físico-químicas de umidade, pH e acidez titulável foram determinadas seguindo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008).

### 2.2 Preparo e padronização do inóculo

Para o preparo da bactéria *Bacillus cereus* (CCCD-B001) foram utilizados 30 mL de meio aquoso contendo caldo triptona de soja (TSB) estéril em um erlenmeyer de 125 mL, e após resfriamento foi inserido, com o auxílio de uma alça de inoculação as bactérias que estavam em meio sólido, previamente preparado. O frasco permaneceu incubado em agitador automático, com controle de temperatura a 200 rpm e 30 °C, durante 24 horas.

Para a padronização do inóculo, as bactérias do pré-inóculo foram diluídas em meio TSB estéril até absorvância 0,05, correspondendo a uma concentração inicial de inóculo de  $2,35 \times 10^{10}$ , conforme curva padrão ( $y = 7.10^{10}x - 2.10^{10}$  e  $R^2$  de 0,9708). A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 650 nm.

## 2.3 Produção de biotensoativo a partir da polpa de abacate

Foi realizado um estudo cinético para avaliar a produção de biotensoativo e consequente diminuição da tensão superficial do caldo fermentativo. As amostras foram retiradas nos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas.

O meio base usado para a fermentação em g/L, foi adaptado de Bueno, Silva e Garcia-Cruz (2010), e apresenta a seguinte composição:  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,5); KCl (0,1);  $KH_2PO_4$  (0,5);  $CaCl_2$  (0,01);  $K_2HPO_4$  (1,0);  $NaNO_3$  (7,0);  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,01); extrato de levedura e a fonte de carbono (polpa de abacate).

A concentração da fonte de carbono e o pH do meio de cultivo variou conforme condições estabelecidas no planejamento fatorial completo  $2^2$ , com três pontos centrais, totalizando 7 experimentos. As variáveis independentes foram o pH e a concentração de substrato (Tabela 1) e a variável dependente (resposta) foi a redução tensão superficial, em relação ao valor inicial de tensão superficial do meio de cultivo, e será expressa em percentual.

Níveis	Concentração de substrato (%)	pH
-1	1,0	5,0
0	2,0	6,0
1	3,0	7,0

Tabela 1: Planejamento fatorial completo  $2^2$ , com três pontos centrais utilizado na produção de biotensoativo, empregando *B. cereus* e polpa de abacate.

## 2.4 Determinação da tensão superficial

A tensão superficial foi calculada utilizando o método do Peso da Gota baseado em Behring et al. (2004), que consiste em usar aparatos de baixo custo. No caso foi utilizado uma bureta (25 mL) fixa a um suporte universal e acoplada totalmente dentro do recipiente coletor (erlenmeyer), para evitar a influência de correntes de ar sobre a formação da gota. Para cada medida foi necessário coletar um volume de 5,0 mL do caldo fermentado, em seguida centrifugado a 2600 rpm, durante 20 minutos, para a remoção das células. Esse volume foi inserido na bureta e sua queda foi ajustada em intervalos de 1 minuto para determinar a massa e o raio da circunferência da gota. Posteriormente calculou-se a tensão superficial ( $\gamma$ ) das amostras pelo peso das gotas e com isso foi possível comparar a tensão obtida com um referencial, a água (0,072 N/m a 25 °C).

A tensão superficial foi calculada por meio da medida da massa (m) de uma gota do líquido, pelo volume da gota (V) e a densidade ( $\rho$ ) conforme a Equação 1.

$$\gamma = \frac{m \cdot g}{2 \cdot \pi \cdot r \cdot f} = \frac{V \cdot \rho \cdot g}{2 \cdot \pi \cdot r \cdot f} \quad (1)$$

Onde, m: média da massa de 10 gotas de amostra em gramas; g: aceleração da gravidade em m/s<sup>2</sup>; r: raio da bureta em metros; f: fator de correção (adimensional);  $\gamma$ : tensão superficial em N/m.

## 2.5 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em no mínimo triplicata. Os dados do delineamento experimental foram submetidos à análise estatística empregando o *software Statistic 7.0*.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Análise físico-química do substrato

A polpa do abacate, variedade brenda, apresentou elevado teor de umidade, no valor de 86%. Esse valor foi superior ao trabalho de Daiuto et al. (2012), que analisaram a variedade hass e encontraram um teor de umidade de 61,75% e Silva et al. (2014) que encontraram uma umidade 77,57% para a variedade brenda, a mesma do presente trabalho. No entanto, menores que o valor encontrado por Miranda, Reck e Clemente (2016), de 88,66%, que analisou a variedade ouro verde, em estágio maduro. É importante ressaltar que a umidade no abacate pode diminuir com o estágio de maturação e, normalmente, são influenciadas pelas condições climáticas, sendo menores em épocas que apresentam menor intensidade de chuvas. Além disso, a umidade pode variar entre as diferentes cultivares (BLEINROTH e CASTRO, 1992).

Alguns autores relatam sobre uma alta correlação entre o teor de umidade e lipídios presentes na polpa de abacate. Neste sentido, é possível destacar o trabalho realizado por Silva et al. (2014), no qual analisaram diferentes cultivares: fortuna (81,57%/10,4%); margarida (80,90%/ 11,9%); ouro verde (79,18%/ 12,3%); brenda (77,57%/ 12,2%); quintal (73,18%/ 13,6%); hass (61,31%/ 20,9%) e fuerte (60%/ 24%), e verificaram um comportamento inverso entre o teor de umidade e lipídio, ou seja, quanto maior o teor de umidade, menor foi o teor de lipídios, valores destacados entre parênteses, respectivamente. Tango, Carvalho e Soares (2004), também verificaram este comportamento, em polpas frescas de 24 variedades de abacates.

Os resultados encontrados neste estudo mostraram um elevado teor de umidade, e apesar de não ter sido analisado os teores de lipídios podemos inferir que de acordo com os estudos relatados acima, a quantidade de lipídios nas amostras indicaria um teor próximo de 10%. Esse parâmetro é extremamente importante para o crescimento microbiano e consequente produção de biotensoativo.

Os valores de acidez e pH do presente trabalho, para a variedade brenda, foram de 1,30 % e 6,95, respectivamente. O pH foi menor que encontrado por Daiuto et al. (2012), que analisaram a polpa da variedade hass e encontraram valores de pH de 6,28, porém obtiveram uma maior acidez (2,10%). Figueiredo Neto et al. (2015) também encontraram um pH (6,57) menor e uma acidez maior (2,34%), para a variedade geada. No entanto, Chaves et al. (2013), relataram, para polpa de abacates da variedade margarida, pH um pouco superior (7,52) e acidez menor (0,93%) do que dos frutos avaliados neste trabalho.

De acordo com Vieites, Daiuto e Fumes (2012) o teor de acidez de abacates tende a aumentar quando se atinge o pico respiratório, com posterior decréscimo. Além disso, Figueiredo Neto et al. (2015), que avaliou a resistência dos frutos de abacate submetidos ao armazenamento, indicou que a acidez e o pH dependem da condição e do tempo em que os frutos são armazenados. Conforme o tempo de armazenamento aumenta, ocorre uma redução dos valores de pH e conseqüentemente um aumento de acidez.

### 3.2 Produção de biotensoativo a partir de polpa de abacate

A Figura 1 apresenta a cinética de produção de biotensoativo a partir da polpa de abacate. A condição que melhor favoreceu a produção de BT, foi aquela em que houve maior redução de tensão superficial. No caso essa condição foi alcançada em apenas 24 horas (0,036 N/m) de fermentação. Após esse período a tensão superficial voltou a subir significativamente ao longo das 96 horas analisadas. Esses resultados foram superiores aos obtidos por Pinto, Martins e Costa (2009) que obtiveram valores de tensão superficial variando de 0,042 a 0,057 N/m, após 72 horas de fermentação, para diferentes culturas de microrganismos (cultura pura de *Corynebacterium aquaticum*; cultura mista contendo *Corynebacterium aquaticum* e *Bacillus* sp.; cultura mista contendo *Corynebacterium* sp., *Bacillus cereus* e *Bacillus mycoides* e cultura pura de *Bacillus subtilis*) empregando glicose como fonte de carbono.

Esses resultados podem ser considerados promissores, principalmente sob o ponto de vista de economia de tempo, quando comparado com estudos reportados na literatura científica. Bezerra et al. (2012) avaliou a produção de BT empregando manipueira como substrato para a fermentação submersa com *Pseudomonas aeruginosa* e apontam uma tensão superficial média de 0,033 N/m após 48 horas de fermentação. Raza, Khan e Khalid (2007) avaliaram diferentes fontes de carbono para a síntese de BT, utilizando *Pseudomonas putida* e obtiveram tensões superficiais de 0,035 N/m após 7 dias de cultivo.

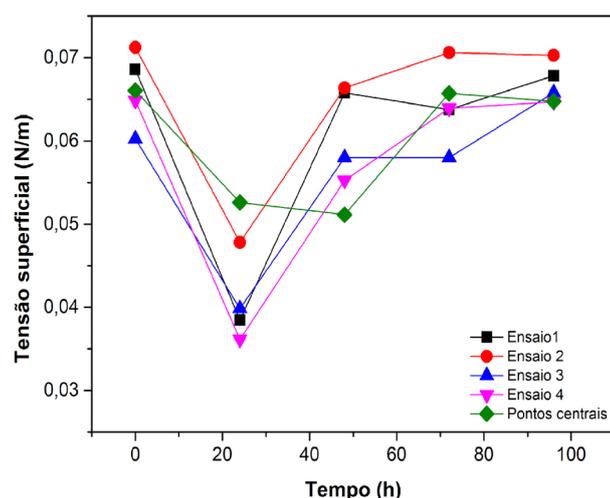


Figura 1. Cinética de produção de biotensoativo por *B. cereus*, de 0 a 96 horas, empregando a polpa de abacate como substrato

O controle e a otimização das condições operacionais são fundamentais para o sucesso da ampliação de escala de produção de biossurfactantes, capazes de torná-los economicamente competitivos em relação aos surfactantes químicos. Dessa forma, o efeito do pH e da concentração da fonte de carbono na produção de BS foram avaliados empregando um planejamento fatorial completo  $2^2$ , com três pontos centrais (Tabela 2). Foram usados os dados de tensão superficial de 24 horas de cultivo, visto que nesse tempo de fermentação foram obtidos os menores valores de tensão superficial. Para a análise estatística os dados de tensão superficial foram convertidos em redução de tensão superficial (RTS), em relação a tensão superficial inicial, e expressos em percentual (%).

Ensaio	pH	Substrato (%)	RTS (%)
1	-1 (5,0)	-1 (1)	43,92
2	1 (7,0)	-1 (1)	32,91
3	-1 (5,0)	1 (3)	33,86
4	1 (7,0)	1 (3)	44,28
5	0 (6,0)	0 (2)	15,11
6	0 (6,0)	0 (2)	15,13
7	0 (6,0)	0 (2)	15,14

Tabela 2. Matriz do planejamento fatorial completo  $2^2$ , como três pontos centrais, para a produção de BT a partir da polpa de abacate, com as respostas expressas em termos de redução de tensão superficial

Pela Tabela 2 observa-se que a maior redução de tensão superficial (44,28%) ocorreu nas condições do ensaio 4, com pH 7,0 e 3,0% de substrato. No entanto, o ensaio 1 apresentou uma redução de tensão superficial similar (43,92%), empregando 1,0% de

substrato e pH 5,0. Essa redução de tensão superficial em pHs diferentes podem estar relacionadas ao fato que o *B. cereus* tolera uma ampla faixa de pH, que vai de 4,9 até 9,3 (BATISTA et al., 2018).

Observa-se também que não há predominância de uma condição experimental entre os 2 ensaios que apresentaram a maior redução de tensão superficial. No entanto, os contrastes significativos na síntese de biotensoativo empregando polpa de abacate pode ser observado no diagrama Pareto mostrado na Figura 2.

Pela Figura 2 observa-se que a ambos os contrastes estudados foram significativos, ao nível de probabilidade de 5% ( $p < 0,05$ ), na redução de tensão superficial, sendo que a concentração de substrato apresentou efeito positivo, enquanto que para o pH esse efeito foi negativo. O efeito negativo do pH significa que ao sair do nível inferior (-1) para o superior (1) haverá um decréscimo no efeito da resposta. Dessa forma, o aumento do pH de 5 para 7 pode resultar em uma redução de 21,78% na síntese de biotensoativo. O efeito positivo da concentração de substrato representa que o aumento da concentração da polpa de abacate de 3,0% pode acarretar em um aumento de 48,36% na síntese de biotensoativo

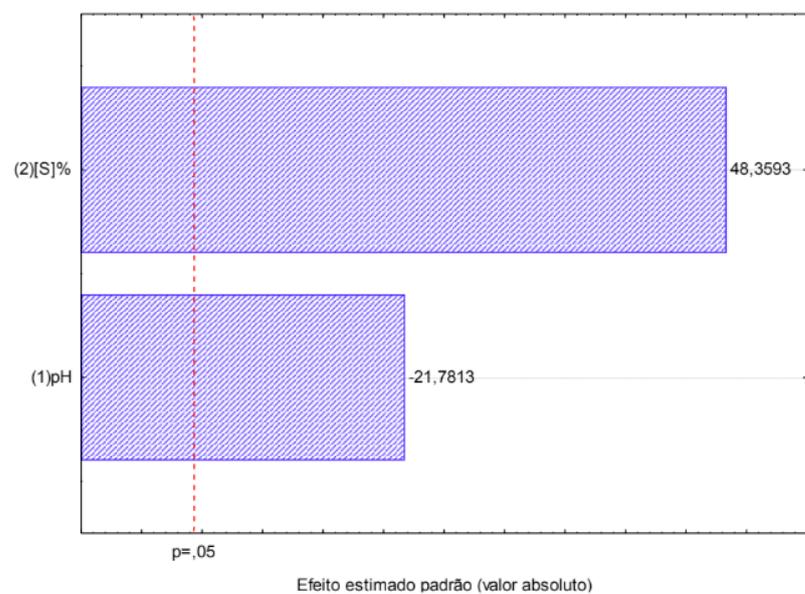


Figura 2. Diagrama de Pareto para a estimativa dos efeitos do pH e concentração de substrato na redução de tensão superficial, empregando polpa de abacate como substrato

Dessa forma, analisando o conjunto de resultados da Tabela 1 e o diagrama de Pareto, as condições experimentais do ensaio 4 (pH 7,0 e 3% de substrato) podem ser consideradas como as mais adequadas para a síntese de biotensoativo a partir de polpa de abacate e empregando *B. cereus*. Khademolhosseini et al. (2019) avaliaram a produção de BT por *P. aeruginosa* e observaram que, quanto mais elevada a concentração da fonte de carbono, maior foi o rendimento do processo fermentativo para a síntese do biosurfatante do tipo glicolipídio.

## 4 | CONCLUSÃO

A polpa de abacate apresentou elevada umidade, acidez baixa e pH próximo a neutralidade. Na fermentação submersa, a polpa de abacate mostrou-se um potencial fonte de carbono para ser utilizada na produção de biotensoativo, visto que reduziu a tensão superficial do meio de cultivo em 24 horas. Ambas as variáveis estudadas influenciaram na redução de tensão superficial, sendo que a concentração de substrato foi a que apresentou maior efeito. As condições experimentais que melhor favorecem a produção de biotensoativo foram pH 7,0 e concentração de substrato de 3%. Além disso, o abacate como substrato de origem renovável assegura o baixo custo na produção, sendo um fruto bastante cultivado no Brasil.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Centro Tecnológico do Estado de Mato Grosso (CTMAT), pertencente à Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), pelo suporte estrutural e às agências de fomento à pesquisa pelo apoio financeiro, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT), processo n° 0575980/2017 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de Iniciação Científica de Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (PIBITI), processo n° 165459/2018-2, e pela bolsa de pesquisa DCR, processo n°313859/2017-5.

## REFERÊNCIAS

ARAÚJO, L. V.; FREIRE, D. M. G.; NITSCHKE, M. Biosurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Química Nova**, v. 36, n. 6, p. 848-858, 2013.

BATISTA, R. D.; PEREIRA, C.F.; OLIVEIRA, A. I. T.; SILVA, J.F.M. contaminação por *bacillus cereus* e os riscos gerados através da intoxicação alimentar. **Revista Desafios**, v. 5, p.30-40, 2018.

BEHRING, J. L.; LUCAS, M.; MACHADO, C.; BARCELLOS, I. O. Adaptação no Método do Peso da Gota para Determinação da Tensão Superficial: um Método Simplificado para a Quantificação da CMC de Surfactantes no Ensino da Química. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 492-495, 2004.

BEZERRA, M. S.; HOLANDA, V. C.; AMORIM, D J. A.; MACEDO, G. R.; SANTOS, E. S. Produção de biotensoativo utilizando *Pseudomonas aeruginosa* e resíduo agroindustrial (manipueira) como substrato. **Holos**, v. 1, p. 14-27, 2012.

BLEINROTH, E. W.; CASTRO, J. V. de. Matéria-prima. In: ABACATE – cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos. Campinas: ITAL, p. 58-147, 1992.

BUENO, S. M.; SILVA, A. N.; GARCIA-CRUZ, C. H. Estudo da produção de biosurfactante em caldo de fermentação. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1572-1577, 2010.

CENTRO DE QUALIDADE EM HORTICULTURA- CEAGESP. Normas de classificação- Programa Brasileiro para a modernização da horticultura. v. 13, 2015. Disponível em: <http://www.ceagesp.gov.br/wp-content/uploads/2015/07/abacate.pdf>. Acesso em 17 abr. 2020.

- CHAVES, M. A.; MENDONÇA, C. R. B.; BORGES, C. D.; PORCU, O. M. Elaboração de biscoito integral utilizando óleo e farinha da polpa de abacate. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 31, p. 215-226., 2013.
- DAIUTO, E. R.; VIEITES, R. L.; TREMOCOLDI, M. A.; VILEIGAS, D. F. Estabilidade físico-química de um produto de abacate acondicionado em diferentes embalagens e conservado pelo frio. **Alimentos e Nutrição**, v.21, n.1, p. 99-107, 2010.
- DAIUTO, E. R.; SIMON, J. W.; VIEITES, R. L.; CARVALHO, L. R.; RUSSO, V. C. Aceitabilidade e viabilidade tecnológica da elaboração de dois produtos de abacate “hass”. **Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha**, v. 13, n. 1, p. 66-75, 2012.
- DAIUTO, E. R.; TREMOCOLDI, M. A.; ALENCAR, S. M.; VIEITES, R. L.; MINARELLI, P. H. Composição química e atividade antioxidante da polpa e resíduos de abacate □HASS□. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 2, p. 417-424, 2014.
- FIGUEIREDO NETO, A.; LIMA JÚNIOR, P. S.; SILVA NETO, J. A. DA; LEANDRO NASCIMENTO, A.; OLIVIER, N. C. Resistência dos frutos de abacate submetidos à compressão durante o armazenamento. **Engenharia na Agricultura**, v. 23, n. 2, p. 119-127, 2015.
- HABA, E.; SPUNY, M.J.; BUSQUETS, M. Screening and Production of Rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from Waste Frying Oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 379-387, 2000.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: ANVISA, 2008.
- KHADEMOLHOSSEINI, R.; JAFARI, A.; MOUSAVI, S.M.; HAJFARAJOLLAH, H., NOGHABI, K.A.; MANTEGHIAN, M. Physicochemical characterization and optimization of glycolipid biosurfactant production by a native strain of *Pseudomonas aeruginosa* HAK01 and its performance evaluation for the MEOR process. **RSC Advances**, v. 9, p. 7932, 2019.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Alimentos regionais brasileiros**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.
- MIRANDA, N. L.; RECK, I. M.; CLEMENTE, E. Utilização de polpa de abacate em formulações de bebidas lácteas probióticas. **Revista UNINGÁ Review**, v. 2, n. 3, p. 35-39, 2016.
- MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; RAVI, T.K.; SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfactants: Properties, Commercial Production and Application. **Current Science**, v. 94, n. 6, p. 736-747, 2008.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.
- NITSCHKE, M.; SILVA, S. S. Recent food applications of microbial surfactants, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 4, p. 631-638, 2018.
- PINTO, M. H.; MARTINS, R. G.; COSTA, J. A. V. Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2104-2108, 2009.
- RAZA, Z. A.; KHAN, M. S.; KHALID, Z. M. Evaluation of distant carbon sources in biosurfactant production by a gamma ray-induced *Pseudomonas putida* mutant. **Process Biochemistry**. v. 42, p. 686- 692, 2007.
- ROVINA, F.; EHRHARDT, D. D.; TAMBOURGI, E. B. Utilização do resíduo da casca de laranja para produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*. **Scientia Plena**, v. 14, n. 4, p. 044201, 2018.

SANTOS, D. K. F.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 401, 2016.

SILVA, F. O. R.; RAMOS, J. D.; OLIVEIRA, M. C. DE; RUFINI, J. C. M.; RAMOS, P. DE S. Fenologia reprodutiva e caracterização físico-química de abacateiros em Carmo da Cachoeira, Minas Gerais. **Revista Ceres**, v. 61, n 1, p. 105-111, 2014.

TANGO, J. S.; CARVALHO, C. R. L.; SOARES, N. B. Caracterização física e química de frutos de abacate visando a seu potencial para extração de óleo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, p. 17-23, 2004.

VIEITES, R. L.; DAIUTO, E. R.; FUMES, J. G. F. Capacidade antioxidante e qualidade pós colheita de abacate 'Fuerte'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 2, p. 336-348, 2012.

## REAÇÕES BIOCATALÍTICAS COMO POTENCIAL PARA OBTENÇÃO DE BIOPRODUTOS

*Data de aceite: 01/07/2020*

*Data de submissão: 26/05/2020*

### **Magno de Lima Silva**

Universidade Federal do Cariri

Juazeiro do Norte – Ceará

<http://lattes.cnpq.br/0372593129516445>

### **Wellyson Journey dos Santos Silva**

Faculdade de Tecnologia do Cariri

Juazeiro do Norte – Ceará

<http://lattes.cnpq.br/0494672835953223>

### **Natasha Matos Monteiro**

Faculdade de Tecnologia do Cariri

Juazeiro do Norte – Ceará

<http://lattes.cnpq.br/0304829274113765>

### **Allana Kellen Lima Santos Pereira**

Universidade Federal do Cariri

Juazeiro do Norte – Ceará

<http://lattes.cnpq.br/0637655944601899>

**RESUMO:** A Biotecnologia é uma área de pesquisa estratégica para a amplificação científica, tecnológica, econômica, ambiental e social do Brasil. A biocatálise se baseia nos estudos relacionados com modificações estruturais em compostos químicos utilizando enzimas como principal fonte catalítica. As enzimas envolvem sete classes principais, são

elas: oxirredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases, ligases e translocases, podendo ser utilizadas nos setores alimentícios, para produzir papéis e celulose, no setor têxtil e no setor de fármacos. O trabalho fundamenta-se em uma revisão de literatura sustentada na exploração de algumas pesquisas que tiveram como foco principal a fabricação de bioprodutos com interesse industrial. Em uma pesquisa sobre métodos alternativos com o óleo de girassol para produzir biodiesel, se fez uso da versatilidade das enzimas, mais especificamente a lipase PS Amano. Os resultados do estudo mostraram que o método se apresentou satisfatório em especial, com 24 horas de reação, obtendo rendimento de até 70%. Outro estudo sobre a obtenção do monoacrilato de frutose usando uma lipase comercial como catalisador em reação de esterificação do ácido acrílico com D-frutose, obteve resultados que expressaram produção de monoéster durante 24 horas de reação para razão molar frutose:ácido acrílico de 1:3 e com o uso de 3g de peneira molecular, havendo um favorecimento da síntese contínua dos ésteres com 84 % de conversão da frutose inicial e 41 % da conversão de ácido acrílico. Os trabalhos mostraram-se bastante promissores, mas que ainda não é aconselhável o emprego de enzimas como o único meio de produção nos

setores industriais, pois necessita se obter conhecimento geral e aprofundado dos microorganismos, além de procurar buscar a difusão e a conquista de novas enzimas capazes de atuar em ambientes mais extremos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Enzimas, Biocatalisador, Reações químicas.

## BIOCATALYTICAL REACTIONS AS A POTENTIAL TO OBTAIN BIOPRODUCTS

**ABSTRACT:** Biotechnology is a strategic research area for the scientific, technological, economic, environmental and social expansion of Brazil. Biocatalysis is based on studies related to structural changes in chemical compounds using enzymes as the main catalytic source. Enzymes involve seven main classes, namely: oxidoreductases, transferases, hydrolases, lyases, isomerases, ligases and translocases, which can be used in the food sectors, to produce paper and cellulose, in the textile sector and in the pharmaceutical sector. The work is based on a literature review based on the exploration of some research that had as main focus the manufacture of bioproducts with industrial interest. In a research on alternative methods with sunflower oil to produce biodiesel, he made use of the versatility of the enzymes, more specifically the lipase PS Amano. The results of the study showed that the method was particularly satisfactory, with 24 hours of reaction obtaining a yield of up to 70%. Another study on obtaining fructose monoacrylate using a commercial lipase as a catalyst in an esterification reaction of acrylic acid with D-fructose, obtained results that expressed monoester production during 24 hours of reaction for 1: 3 fructose: acrylic acid molar ratio and with the use of 3g molecular sieve, favoring the continuous synthesis of esters with 84% conversion of the initial fructose and 41% conversion of acrylic acid. The work has shown to be quite promising, but it is still not advisable to use enzymes as the only means of production in industrial sectors, as it is necessary to obtain general and in-depth knowledge of microorganisms, in addition to seeking to disseminate and conquer new enzymes. capable of operating in more extreme environments.

**KEYWORDS:** Enzymes, Biocatalyst, Chemical reactions.

## 1 | INTRODUÇÃO

No decorrer dos anos, a humanidade sempre procurou aprimorar suas ferramentas e processos no intuito de se obter uma maior produtividade com custos reduzidos e atualmente essa busca parece ser bem mais complexa, pois, além de assegurar a ampliação de novos processos que maximizem a construção e diminuam os custos, surge a preocupação com a responsabilidade ambiental para que os sistemas de produção e transformação não tenham que sacrificar o ecossistema para alcançar seus objetivos (RODRIGUES, 2012).

A Biotecnologia é uma área de pesquisa estratégica para a amplificação científica, tecnológica, econômica, ambiental e social do Brasil, devido à biodiversidade que

caracteriza os vários biomas espalhados pelo país (DE FREITAS *et al.*, 2017; BRASIL, 2012; BRASIL, 2016).

O Brasil, atualmente mesmo apresentando uso reduzido de enzimas em processos industriais quando comparado com outros países é um dos mais importantes na importação de enzimas. Assim, o Brasil incorporando e consolidando-se como produtor de tecnologia enzimática torna-se fundamental (MONTEIRO; SILVA, 2009).

Na química orgânica, biotransformações de substâncias orgânicas ou biocatálise, pode ser entendida como a utilização da catálise enzimática para realizar pequenas modificações em substâncias orgânicas (DE OLIVEIRA, K.; DE OLIVEIRA, B., 2012). A biocatálise se baseia nos estudos relacionados com modificações estruturais em compostos químicos utilizando enzimas como principal fonte catalítica (ALVES *et al.*, 2010).

Holanda (2019) afirma que pela ação de agentes microbiológicos (bactérias e fungos) os processos de biodegradação sofridos pelos compostos orgânicos, causam alterações nas diversas substâncias deixando-as com poder menor de toxicidade em grande parte dos casos, isso fez com que o interesse em aplicá-los a ensaios biológicos, onde os segmentos ambientais, industriais, agrícolas e farmacêuticos apresentam-se gradualmente utilizando como um potencial biotecnológico.

Segundo Monteiro e Silva (2009), as reações químicas que são envolvidas nos processos industriais, são catalisadas usualmente por catalisadores químicos que podem ser trocados por enzimas, compreendidas por moléculas com a habilidade em acelerar os processos químicos, apresentando maior vantagem por frente aos catalisadores químicos e serem ecologicamente mais viáveis.

As enzimas são definidas como catalisadores biológicos essencialmente de natureza proteica, que participam em várias reações bioquímicas, tendo como papel fundamental o controle metabólico (RIBEIRO *et al.*, 2013). A tecnologia enzimática concilia desenvolvimento tecnológico com o uso de matérias-primas renováveis e a atenção com as questões ambientais, cenário importante para a colocação do Brasil no mercado internacional (FERNANDES, 2016; POLITZER; BON, 2006).

A usabilidade de biocatalisadores apresenta inúmeras vantagens quando comparados com a catálise química (homogênea ou heterogênea) convencional devido suas propriedades consideradas únicas (ALVES, 2013; NAKAMURA *et al.*, 2003; SAXENA *et al.*, 1999).

As características inerentes das enzimas, são: seu poder de agir em condições amenas de temperatura e de pressão, versatilidade ao catalisar as mais diferentes reações, agir em solventes orgânicos, apresentar nenhuma ou reduzida produção de compostos tóxicos na natureza e além disso, sua quiralidade específica evidencia elevada quimio-, regio-, e enantiosseletividade, o que confere destaque a esses catalisadores (SOUZA *et al.*, 2012; COELHO, 2008).

Ainda, o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia molecular (NC-IUBMB) classifica as enzimas quanto o caráter da reação catalisada que envolve em sete classes principais, são elas: oxirredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases, ligases e translocases. Os quais levam a distintas aplicações industriais.

De acordo com Monteiro e Silva (2009) a geração de enzimas tem grande interesse biotecnológico, pois esses biocatalisadores podem ser retirados dos tecidos animais, vegetais e de micro-organismos, podendo ser utilizadas nos setores alimentícios, para produzir papéis e celulose, no setor têxtil e no setor de fármacos.

No setor alimentício as enzimas  $\beta$ -glucanases são empregadas no preparo do mosto para fabricação de cerveja e são adicionadas às rações animais para tornar maior a digestibilidade das  $\beta$ -glucanas presentes em grãos como trigo, cevada, aveia e centeio (ORLANDELLI, *et al.*, 2012; MCCARTHY *et al.*, 2005; KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002).

Wanderley, Neves e Andrade (2011) afirmam que as enzimas conseguem substituir substâncias químicas sintéticas em muitos processos e contribuir com a produção ou gerar benefícios para proteção do planeta, por meio da biodegradabilidade e pelo consumo reduzido de energia, fazendo que sejam mais específicas as enzimas em sua ação do que as substâncias químicas sintéticas, produzindo menos subprodutos residuais, propiciando produtos de melhor qualidade e diminuindo as chances de poluição.

Segundo Uenojo e Pastore (2007), as enzimas na indústria de tecidos, são utilizadas tanto para destruir a pectina que forma a camada que recobre as fibras de celulose ou como para esmigalhar as fibras vegetais, como o linho, o cânhamo e juta, na biopreparação de algodão e no polimento enzimático de tecidos mistos de juta e algodão.

O uso da enzima xilanase possui grande aplicação desde 1980 na indústria de papel e celulose, sendo usada no clareamento da polpa atuando para reduzir a utilização de cloretos nessa etapa do processo. Uma das desvantagens das enzimas é a sensibilidade a variações de aumento de calor e pH, elas possuem um faixa de pH e temperatura ótimos em que operam (METELSKI, 2018).

Seguido dos antibióticos, as enzimas são os produtos microbianos mais procurados na indústria biotecnológica, podendo ter uma aplicação tanto na indústria de medicamentos e desenvolvimento de novos produtos, quanto em análises clínicas e terapia, levando o setor de medicamentos a um dos maiores produtores e usuários de enzimas (MONTEIRO; SILVA, 2009).

Dentre as diversas fronteiras estratégicas necessárias a fim de se obter o desenvolvimento, fica evidente como a biotecnologia merece destaque, pois consiste numa área dinâmica, multidisciplinar, intimamente relacionada a processos comprometidos com a química verde e que aceita a união do economicamente viável com o ecologicamente correto (GONÇALVES; MARSAIOLI, 2013).

Assim, objetivou-se realizar neste estudo uma avaliação sobre a capacidade de aplicabilidade dessas enzimas no ramo de bioprodutos.

## 2 | METODOLOGIA

A metodologia deste trabalho fundamenta-se em uma revisão de literatura sustentada na exploração de algumas pesquisas que tiveram como foco principal a fabricação de bioprodutos com interesse industrial.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

Marder *et al.* (2008) ao pesquisar métodos alternativos com o óleo de girassol para produzir biodiesel, fez uso da versatilidade das enzimas, mais especificamente a lipase PS Amano. Para tal, esferas de hidrogel comercial foram fabricadas e utilizadas na imobilização da enzima em solução aquosa, o processo de transesterificação do óleo vegetal foi realizado e análise por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) foi empregada. Os resultados do estudo mostraram que o método se apresentou satisfatório em especial, com 24 horas de reação obtendo rendimento de até 70%.

Tomasi *et al.* (2011) avaliou as condições de formação do ibuprofeno por meio enzimático usando lipase em forma livre com objetivo de expandir seu potencial farmacológico e garantir uma produção com bom rendimento e poucos resíduos. Inicialmente, obteve-se o éster de Ibuprofeno, partindo a verificação de rendimento e caracterização da amostra por titulometria volumétrica e cromatografia em camada delgada (CCD). A análise dos resultados evidenciou temperatura de 25°C no tempo de 5 minutos e pH 6 como melhores parâmetros de esterificação da lipase. Apresentando-se como um método útil.

Ayres (2010) em seu estudo, buscou as melhores rotas para se obter o monoacrilato de frutose usando uma lipase comercial como catalisador em reação de esterificação do ácido acrílico com D-frutose. Seus resultados expressaram produção de monoéster durante 24 horas de reação para razão molar frutose:ácido acrílico de 1:3 e com o uso de 3g de peneira molecular, houve um favorecimento da síntese contínua dos ésteres com 84 % de conversão da frutose inicial e 41 % da conversão de ácido acrílico.

Da Silva *et al.* (2012) testaram a utilização de diferentes vegetais com fins de descobrir fontes enzimáticas novas para uso em reações de biorredução da acetofenona. Nesse sentido, avaliaram o uso da casca da banana (*Musa*), das sementes de neem (*Azadirachta indica A. Juss*), da cenoura (*Daucus Carota*) e do malvarisco (*Plectranthus Amboinicus*) com reações feitas em meio aquoso por 72h, utilizando 20g do material vegetal e 0,100mL do substrato. Os resultados mostraram que dos vegetais avaliados, o teor de conversão da banana apresentou-se baixo (9,35%) e elevado excesso enantiomérico (99%), no malvarisco obteve-se baixa conversão (5,2%) e um desdenhável excesso enantiomérico (4,8%), o neem obteve uma boa enantiosseletividade (90,47%) mas um teor de conversão baixo (8,35%) e a cenoura mostrou uma ótima conversão (80,55%) e um excelente excesso

enantiomérico (>99%). Mostrando que é bastante viável o emprego de enzimas vegetais.

Bizerra *et al.* (2009) realizaram uma investigação sobre o potencial de biorredução das enzimas presentes em feijão de corda seco, feijão carioca, feijão preto, feijão de corda verde e feijão fava, com diferentes variedades ou estados maturacionais utilizando acetofenona e cloro-nitro-benzeno como substratos nas reações e ainda foram testadas reações de biorredução de acetofenona utilizando extrato de tampão fosfato (pH=6.5) enzimático de feijão de corda seco em diferentes quantidades de volume. Os resultados expressaram que as espécies usadas atuaram com bons percentuais de conversão, destacando-se os melhores excessos enantioméricos (e.e) obtidos com as espécies: feijão de corda seco (*Vigna unguiculata*) e o feijão carioca (*Phaseolus vulgaris*). Os excessos enantioméricos (e.e) melhoram significativamente com o uso da solução tampão enzimática, mas a conversão diminui sensivelmente.

Bizerra *et al.* (2008) investigaram na casca do coco tipo amarelo da espécie *Cocos nucifera L.* o potencial de biorredução das enzimas presentes, para a obtenção dos respectivos álcoois, utilizou-se benzaldeído, anisalaldeído, p-metóxi-benzaldeído, cinamalaldeído, furfural, acetofenona, ciclopentanona, carvona e  $\beta$ -ceto-éster como substratos. Nas cetonas, apenas o substrato  $\beta$ -ceto-ester que apresentou um excelente rendimento e para o restante apresentaram baixos percentuais de conversão. Os resultados mostraram que a casca do coco amarelo se apresentou como potente agente biorredutor, principalmente com aldeídos e algumas cetonas.

#### 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em função dos resultados obtidos, os trabalhos utilizados nesta revisão, mostraram-se bastante promissores onde enfatizam a temática principal do estudo, que baseia-se no uso de procedimentos de fabricação que minimizem os efeitos agravantes ao ecossistema e que possuam maior rendimento a fim de serem utilizados em larga escala na indústria de biotecnologia. Porém, ainda percebe-se dificuldades na implementação dessas técnicas, por muitas vezes, o processo se tornar economicamente oneroso.

Conclui-se então, que ainda não é aconselhável o emprego de enzimas como o único meio de produção nos setores industriais, pois necessita se obter conhecimento geral e aprofundado dos micro-organismos, além de procurar buscar a difusão e a conquista de novas enzimas capazes de atuar em ambientes mais extremos.

#### REFERÊNCIAS

ALVES, L. A. **Processos biocatalíticos utilizando o complexo enzimático dos rizomas de Ipomoea batatas (batata-doce)**. 2013. 162 f. Tese (Doutorado em química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2013.

ALVES, L. A.; BERTINI, L. M.; BIZERRA, A. M. C.; MONTE, F. J. Q.; DE MATOS, M. C.; DE LEMOS, T. L. G. Bioprospecção de espécies vegetais em reações de biorredução. 2010. In: **33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindóia - SP.

AYRES, B. M. T. **Obtenção de acrilatos de frutose por biocatálise**. 2010. 53 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. Campinas, SP.

BIZERRA, A. M. C.; LEMOS, T. L. G.; BERTINI, L. M.; OLIVEIRA, M. C. F.; MATTOS, M. C. Uso de espécies de feijão em diferentes estados maturacionais ou cultivares em biorreduções. **32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Fortaleza – CE**. 2009.

BIZERRA, A. M. C.; LEMOS, T. L. G.; OLIVEIRA, M. C. F.; MATTOS, M. C. Uso das cascas de Cocos nucifera tipo amarelo em biorreduções de aldeídos e cetonas. **31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia – SP**. 2008.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Estratégia nacional de ciência, tecnologia e inovação 2012 – 2015. Brasília, DF, 2012. Disponível em: < <https://livroaberto.ibict.br/218981.pdf> > Acesso em: 06 Mai. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Tesouro Eletrônico. Biotecnologia. 2016. Disponível em: < [http://www.ripsa.org.br/lis/resource/29571#.XrQL0Z\\_J1Bd](http://www.ripsa.org.br/lis/resource/29571#.XrQL0Z_J1Bd) > Acesso em: 06 Mai. 2020.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia enzimática** - Rio de Janeiro: FAPERJ; Petrópolis, RJ: EPUB, p. 264, 2008.

DA SILVA, F. F. M.; BERTINI, L. M.; SOUZA, G. D. S.; DE LEMOS, T. L. G.; DE MATTOS, M. C. Análise do potencial de Diferentes Vegetais na Biorredução enantiosseletiva da acetofenona. In: **VII CONNEPI- Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação**. 2012.

DE FREITAS, J. E. B.; MAZZETTO, S. E.; DO AMARAL, R. M.; DE FARIA, L. I. L.; LEIVA, D. R.; MILANEZ, D. H. Análise bibliométrica da produção científica brasileira e do Nordeste em Biotecnologia. **Em Questão**, v. 23, n. 3, p. 228-249, 2017.

DE OLIVEIRA, K. B.; DE OLIVEIRA, B. H. Obtenção de substâncias bioativas através da biotransformação de produtos naturais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 9, n. 1, p. 11-11, 2012.

FERNANDES, R. N. **Utilização do bagaço de cana-de-açúcar, água de maceração de milho e farinha da casca de maracujá para a produção de celulasas pelo termofílico Bacillus sp**. 65 f. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias. Alegre - ES. 2016

GONÇALVES, C.; MARSAIOLI, A. J. Fatos e tendências da biocatálise. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1587-1590, 2013.

HOLANDA, F. H. **Biodegradação do cloranfenicol por fungos endofíticos isolados de Bertholletia excelsa (Castanha-do-Brasil)**. 2019. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Pós-Graduação, Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2019.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. Current Opinion in Biotechnology, **London**, v. 13, n. 4, p. 345-351, ago. 2002.

MARDER, F.; CEOLIN, M. M.; DA SILVA MAZUIM, M.; DE SOUZA SCHNEIDER, R. D. C.; MACAGNAN, M. T.; CORBELLINI, V. A. Produção de biodiesel por biocatálise utilizando método alternativo de imobilização da lipase em hidrogel. **Tecno-Lógica**, v. 12, n. 2, p. 56-64, 2008.

MCCARTHY, T. C.; LALOR, E.; HANNIFFY, O.; SAVAGE, A. V.; TUOHY, M. G. Comparison of wild-type and UV-mutant  $\beta$ -glucanase-producing strains of *Talaromyces emersonii* with potential in brewing applications. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, Houndmills**, v. 32, n. 4, p. 125-134, abr. 2005.

METELSKI, L. **Análise da ação enzimática na produção de papel visando a economia de energia**. 2018. 54 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Química) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2018.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. do N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista processos químicos**, v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.

NAKAMURA, K.; YAMANAKA, R.; MATSUDA, T.; HARADA, T. Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 14, p. 2659-2681, 2003.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, 2012.

POLITZER, K.; BON, EP da S. Enzimas industriais e especiais. **CGEE Ciência**, 2006.

RIBEIRO, B. D.; CASTRO, A. M.; SALGADO, A. M.; COELHO, M. A. Z. Aplicação de enzimas: propostas para disciplina experimental. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 5, p. 787-805, 2013.

RODRIGUES, F. E. A. **Processos biocatalíticos utilizando a casca da laranja da terra (*Citrus aurantium L.*)**. 2012. 141 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

SAXENA, R. K.; GHOSH, P. K.; GUPTA, R.; DAVIDSON, W. S.; BRADDOO, S.; GULATI, R. Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry. **Current science**, v. 77, p. 101-115, 1999.

TIPTON, K; MCDONALD, A. A Brief Guide to Enzyme Nomenclature and Classification. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology**. Disponível em: < <https://iubmb.org/wp-content/uploads/sites/10116/2018/11/A-Brief-Guide-to-Enzyme-Classification-and-Nomenclature-rev.pdf> > Acesso em: 06 Mai. 2020.

TOMASI, J.; AMARAL, P.; VAZ, L.; HENDLER, G. H.; AGNES, E. J. Obtenção de compostos químicos bioativos a partir de biocatálise. **Revista Técnico Científica do IFSC**, p. 135, 2011.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.

WANDERLEY, M. D.; NEVES, E.; ANDRADE, C. J. Aspectos da produção industrial de enzimas. **Revista CITINO**, v. 1, n. 1, p. 44-50, 2011.

## EFEITO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS NO CRESCIMENTO RADICULAR DE *CHLOROLEUCON DUMOSUM* (BENTH) G. P. LEWIS

Data de aceite: 01/07/2020

Data de submissão: 05/06/2020

### **Maria Janiele Barbosa de Farias Pereira**

Universidade Federal de Alagoas, *Campus*  
Arapiraca  
Arapiraca – AL

ORCID: 0000-0001-7096-7426

### **Roberta Samara Nunes de Lima**

Universidade Federal de Alagoas, *Campus*  
Arapiraca  
Arapiraca – AL

ORCID: 0000-0002-2226-6825

### **Alaide Maria Silva Santos**

Universidade Federal de Alagoas, *Campus*  
Arapiraca  
Arapiraca – AL

ORCID: 0000-0001-8384-4396

### **Joseliane Fernandes Miguel dos Santos**

Universidade Federal de Alagoas, *Campus*  
Arapiraca  
Arapiraca – AL

ORCID: 0000-0002-5453-5276

### **Wander Gustavo Botero**

Universidade Federal de Alagoas, *Campus*  
Arapiraca  
Arapiraca – AL

ORCID: 0000-0003-1845-6797

### **Flávia de Barros Prado Moura**

Universidade Federal de Alagoas, *Campus* A. C.  
Simões  
Maceió – AL

ORCID: 0000-0003-0014-9561

### **Jakson Leite**

Universidade Federal do Maranhão, *Campus*  
Bacabal  
Bacabal – MA

ORCID: 0000-0003-2019-8037

**RESUMO:** As substâncias húmicas (SH) são compostas de moléculas que podem interagir positivamente com as raízes das plantas e promover seu crescimento, representando um recurso potencial para aplicação na produção de espécies florestais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade de substâncias húmicas no crescimento de raiz de *Chloroleucon dumosum*, uma espécie nativa da caatinga, utilizada em projetos de restauração. Substâncias húmicas de origem ambiental (turfa e torta de filtro) e antropogênica (lodo de estação de tratamento de esgoto) foram avaliadas nas concentrações 0 (controle-H<sub>2</sub>O), 25, 50, 100 e 200 mg L<sup>-1</sup> de SH. Sementes de *C. dumosum* foram escarificadas, embebidas em água por 24 h e transferidas para papel *germitest*, permanecendo por 48 h para germinação. Sementes com radícula de 1 cm

foram cultivadas em tubos tipo *Falcon* com 50 mL da solução da SH em estufa de crescimento BOD a 28 °C com 12 h diária de luz por 8 dias, quando o comprimento da raiz foi medido. A concentração 100 mg L<sup>-1</sup> da SH de turfa promoveu crescimento radicular médio de 8,6 (±1,6) cm. Na SH torta de filtro, a concentração 25 mg L<sup>-1</sup> promoveu maior crescimento de raiz com média de 8,4 (±1,0) cm. Para SH de lodo, a concentração que promoveu maior crescimento da raiz foi a 50 mg L<sup>-1</sup>, com crescimento médio de 8,5 (±1,0) cm. Estes resultados obtidos são promissores quando comparados ao crescimento radicular médio do tratamento controle, que foi de 3,7 (±1,3) cm. As SHs promoveram o crescimento radicular de *C. dumosum*, sendo a resposta dependente da fonte e da concentração da substância húmica.

**PALAVRAS-CHAVE:** Leguminosa, Arapiraca, Crescimento de raiz.

## EFFECT OF HUMIC SUBSTANCES ON THE ROOT GROWTH OF *CHLOROLEUCON DUMOSUM* (BENTH) G. P. LEWIS

**ABSTRACT:** Humic substances (SH) are composed of molecules that can positively interact with the roots of plants and promote their growth; it makes SH a potential resource to grow plant forest species. Here, we aimed to evaluate the activity of humic substances in the growth of *Chloroleucon dumosum*, a native species from Brazilian tropical dry forest (Caatinga) used in restoration projects. Humic substances from environmental samples (peat and filter cake) and anthropogenic activity (sludge from sewage treatment plant) were evaluated at concentrations 0 (control-H<sub>2</sub>O), 25, 50, 100 and 200 mg L<sup>-1</sup> of SH. *C. dumosum* seeds were scarified, soaked in water for 24 h and transferred to germitest paper and left for until germination (48 h). Germinated seeds with 1 cm radicle were grown in Falcon tubes with 50 mL of the SH solution in a BOD chamber at 28 °C with 12 h daily light for 8 days, when root length was measured (cm). The concentration of 100 mg L<sup>-1</sup> of the SH from peat sample promoted root growth of 8.6 (± 1.6) cm. For the SH extracted from filter cake, the concentration 25 mg L<sup>-1</sup> promoted greater root growth with an average of 8.4 (± 1.0) cm. For SH sludge, 50 mg L<sup>-1</sup> was the concentration that promoted greater root growth, inducing foot elongation to 8.5 (± 1.0) cm. These results are promising when compared to the average root growth of the control treatment, which was 3.7 (± 1.3) cm. SHs promoted the root growth of *C. dumosum*, the response being dependent on the source and concentration of the humic substance.

**KEYWORDS:** Legume, Arapiraca, Root growth.

## 1 | INTRODUÇÃO

A matéria orgânica do solo (MOS) é constituída de frações em vários estágios de decomposição, com destaque para as substâncias húmicas que são encontradas em solos, turfas, sedimentos e águas naturais e se apresentam como um sistema complexo de substâncias de diversas naturezas, que podem ser utilizadas como indicadoras da qualidade dos solos (CANELLAS et al., 2001).

As substâncias húmicas (SH), compostas de ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF) e humina (HUM), são os principais componentes da MOS, cerca de 85 a 90 %, e originam-se a partir de transformações bioquímicas de compostos como lignina, celulose, hemicelulose, açúcares, aminoácidos, etc. (LEHMANN, J.; KLEBER, 2015). Os AH são solúveis em meio alcalino e insolúveis em meio ácido diluído. Têm sido definidos como substâncias de coloração escura, compostas por macromoléculas de massa molecular relativamente elevada. Os AF são solúveis em meio alcalino e em ácido diluído, sendo constituídos, sobretudo, por polissacarídeos, aminoácidos e compostos fenólicos. A HUM é insolúvel em meio alcalino e meio ácido, podendo ter composição variada (PICCOLO et al., 1996).

As SHs exercem influência amplamente reconhecida nas propriedades químicas, físicas e biológicas do solo e, conseqüentemente, no crescimento das plantas. Contribuem assim, para melhorar a estrutura do solo, aumentar a produtividade e a qualidade dos cultivos, disponibilizar fósforo adsorvido na fração argila, aumentar a superfície específica, a capacidade de troca catiônica (CTC) e o efeito tampão, dando uma maior estabilidade ao solo e atuando como reservatório de N, P, S e micronutrientes. Neste contexto, as SHs são importantes reguladores funcionais dos processos químicos e biológicos do solo e das plantas, constituindo como um forte fator para a sustentabilidade dos ecossistemas terrestres (PRIMO et al., 2011). Vários trabalhos têm demonstrado que as SH podem influenciar a acumulação de nutrientes e o crescimento vegetal (FAÇANHA et al., 2002). No que se refere à promoção do crescimento radicular, a ação das substâncias húmicas tem sido relacionada com a sua concentração e origem e, ainda, com a espécie da planta utilizada (SILVA et al., 2011).

Ainda, as SHs têm apresentado efeitos benéficos sobre o crescimento e sistema radicular de plantas e tem sido reconhecido em várias pesquisas e trabalhos, no entanto, efeitos específicos destas substâncias sobre as várias partes da planta e estádios de crescimento ainda precisam ser investigados (SILVA et al., 2000), principalmente na produção de mudas de espécies florestais nativas.

A espécie pertence à família Fabaceae (Leguminosae) que é a família com a maior diversidade florística na caatinga, constituindo um terço de toda a diversidade vegetal deste Bioma. A espécie *Chloroleucon dumosum* (Benth) G.P. Lewis (Fabaceae – Mimosoideae (atualmente Caesalpinioideae) - Ingeae) (APNE/CNIP, 2017) é uma espécie decídua, que além da caatinga, ocorre em campos gerais e matas de galerias. É vulgarmente conhecida como arapiraca, pau-rósea ou jurema branca (SOUZA FILHO et al., 2007). Tem ocorrência registrada nos Estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe, Distrito Federal, Minas Gerais e Rio de Janeiro (IGANCI, 2015) e é utilizada em projetos de restauração, pelo seu rápido crescimento e rusticidade.

Na busca de alternativas para reduzir os custos e melhorar o desempenho de mudas

nativas da caatinga, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de substâncias húmicas de diferentes fontes no crescimento radicular de *Chloroleucon dumosum* (Benth) G.P. Lewis.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de *Chloroleucon dumosum* foram coletadas em uma planta matriz localizada no *Campus Arapiraca* da Universidade Federal de Alagoas. As vagens foram coletadas, as sementes beneficiadas e armazenadas em potes plásticos. Os tratamentos consistiram em três fontes de substâncias húmicas (SHs): SH de turfa (TR), SH de lodo (LD) e SH de torta de filtro (TF). As SHs utilizadas nesse estudo foram previamente extraídas e purificadas por Botero et al. (2010). Para cada SH foram avaliadas cinco concentrações (0, 25, 50, 100, 200 mg L<sup>-1</sup> da SH) que corresponderam os tratamentos. Para o preparo das soluções, o humato da SH foi pesado ao equivalente para o preparo de 1 L da concentração desejada. O humato pesado foi inicialmente solubilizado em 100 mL de água destilada em *erlenmeyers* sob agitação de 150 rpm por 24 h. Posteriormente, as amostras foram diluídas para a concentração final desejada, o pH ajustado para 7,0 e foram armazenadas, para posterior utilização.

As sementes de *C. dumosum* foram submetidas à escarificação mecânica com lixa (FILHO et al., 2007), e posterior desinfestação superficial com álcool (70%) por 1 minuto, hipoclorito de sódio (2%) por 3 minutos e 5 lavagens sucessivas em água destilada. Em seguida foram submetidas a um *hydropriming* (LIU et al. 2008), tratamento pré-germinativo em que as sementes são submersas em água por 24 h. As sementes foram transferidas para papel *germitest*, onde permaneceram por 48 h para crescimento radicular. Sementes com radícula de 1 cm foram cultivadas em tubos tipo *Falcon* com 50 mL da solução de SH por oito dias em estufa de crescimento tipo BOD a 28°C com 12h diária de luz. Os tratamentos foram distribuídos de modo inteiramente casualizados com 10 repetições.

O efeito dos tratamentos foi medido usando a variável comprimento da raiz, e o comprimento da raiz foi determinado com base na raiz central. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F e as médias comparadas pelo teste *t* a 5% de probabilidade com o auxílio do software estatístico SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2011).

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

As SHs apresentaram efeito positivo no crescimento radicular de *Chloroleucon dumosum*. A concentração 100 mg L<sup>-1</sup> da SH de turfa promoveu crescimento radicular médio de 8,6 (±1,6) cm, se destacando entre as demais concentrações de SHs (Figura 1 A). Na SH torta de filtro, a concentração 25 mg L<sup>-1</sup> promoveu maior crescimento de raiz com média de 8,4 (±1,0) cm (Figura 1 B). Para a SH de lodo, a concentração que

promoveu maior crescimento da raiz foi a 50 mg L<sup>-1</sup>, com crescimento médio de 8,5 (±1,0) cm (Figura 1 C).

Estes resultados foram significativos quando comparados com o crescimento radicular médio da concentração 0 (controle-H<sub>2</sub>O), que foi de 3,7 (±1,3) cm. As SHs promoveram o crescimento radicular de *C. dumosum* e a resposta foi dependente da fonte e da concentração (Figura 2). Segundo Nardi et al. (2009) e Silva et al. (2011), o principal efeito fisiológico dos materiais húmicos é o aumento no crescimento das raízes, que por sua vez, depende tanto da espécie e idade, como da fonte e concentração de material húmico utilizado.

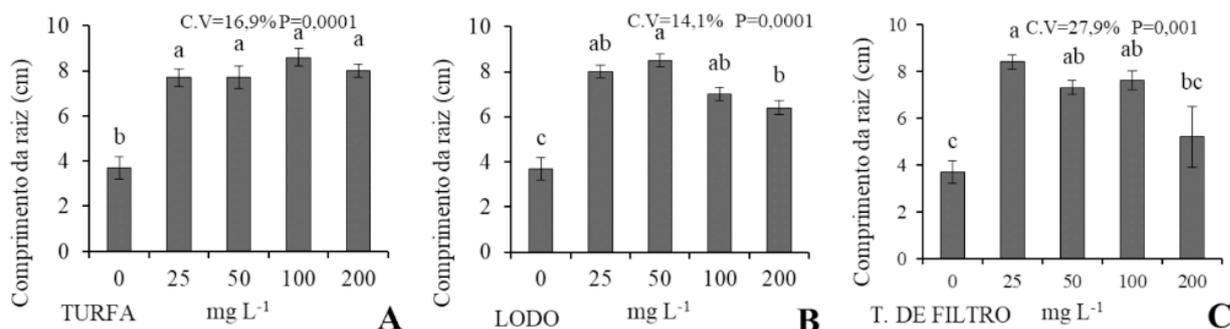


Figura 1. Crescimento radicular de *Chloroleucon dumosum* cultivadas em diferentes tipos e concentrações de substâncias húmicas por 8 dias. Turfa (A), lodo (B) e torta de filtro (C).

Os efeitos das substâncias húmicas nas plantas estão relacionados com o aumento na absorção de nutrientes, devido à influência na permeabilidade da membrana celular e ao poder quelante, bem como à fotossíntese, à formação de ATP, aminoácidos e proteínas. As substâncias húmicas alteram diretamente o metabolismo bioquímico das plantas e, por consequência, podem influir no seu crescimento e desenvolvimento (ROSA et al., 2009).

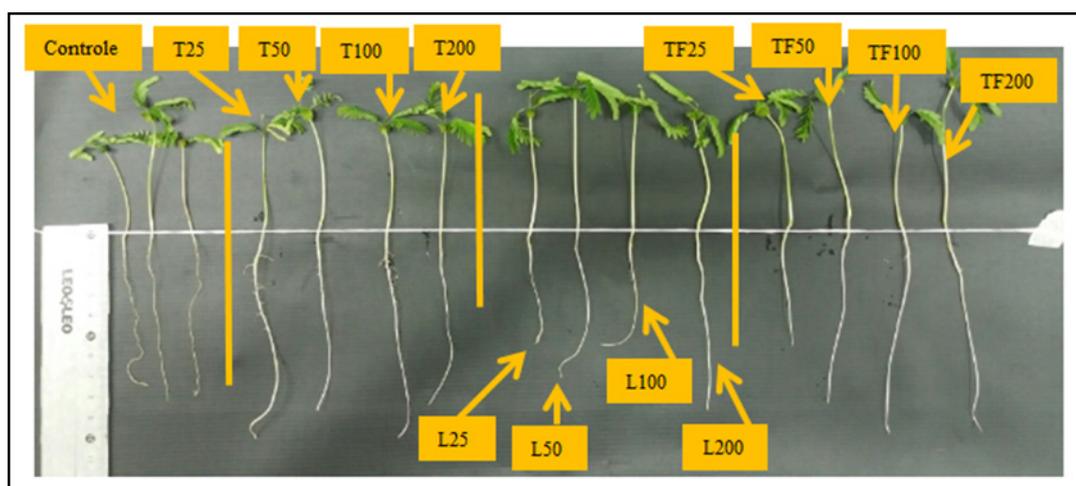


Figura 2. Efeito de diferentes tipos e concentrações de substâncias húmicas em raízes de *Chloroleucon dumosum*. Turfa (T), torta de filtro (TF) e lodo (L).

O mecanismo de crescimento radicular na presença de substâncias húmicas é estudado por Frias et al. (1996) e por Canellas e Olivares (2014) e Silva et al. (2016), os quais citam que as SHs podem aumentar o crescimento da parte aérea e da raiz, conseqüentemente, o aumento da absorção de nutrientes, através da ativação de enzimas que regulam o metabolismo das plantas, tais como H<sup>+</sup>-ATPases, nitrato-redutase e as bombas de prótons.

#### 4 | CONCLUSÃO

As substâncias húmicas extraídas de turfa, lodo e torta de filtro promoveram o crescimento radicular de *Chloroleucon dumosum*, com resposta dependente da fonte e da concentração da substância húmica.

#### REFERÊNCIAS

- APNE/CNIP - Associação Plantas do Nordeste/Centro Nordestino de Informações sobre Plantas. **Banco de dados LPN**. Disponível em: <[www.cnip.org.br](http://www.cnip.org.br)>. Acesso em: 06 jan. 2019.
- BOTERO, W. G. et al. Peat humic substances enriched with nutrients for agricultural applications: competition between nutrients and non-essential metals present in tropical soils. **Journal of Hazardous Materials**, v. 177, n. 1-3, p. 307-311, 2010.
- CANELLAS, L. P. et al. Distribuição da matéria orgânica e características de ácidos húmicos em solos com adição de resíduos de origem urbana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.12, p.1529-1538, 2001.
- CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v.1, n.3, p.1-11, 2014.
- FAÇANHA, A. R. et al. Bioatividade de ácidos húmicos: efeitos sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.37, n.9, p.1301-1310, Brasília, 2002.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**. v.35, n.6, p.1039-1042, Lavras, 2011.
- FILHO, P. R. M. S.; MORAES, M. C.; SIMABUKURO, E. A. Quebra da dormência em *Chloroleucon dumosum* (Benth) G.P. Lewis. **Revista Brasileira de Biociências**. v.5, supl.2, p.33-35, Porto Alegre, 2007.
- IGANCI, J.R.V. *Chloroleucon* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro 2015. Disponível em: <http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB18404>. Acesso em: 10 nov. 2018.
- LEHMANN, J.; KLEBER, M. The contentious nature of soil organic matter. **Nature**, 528,60–68, 2015. <https://doi.org/10.1038/nature16069>
- LIU, H.; GUO, Z. G.; WANG, Y. R. Optimal conditions for hydropriming lucerne seeds. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v.51, p.69-75, 2008.

NARDI, S. et al. **Biological activities of humic substances**. In: SENESI, N.; XING, B. & HUANG, P.M., eds. Biophysico-chemical processes involving natural nonliving organic matter in environmental systems. New Jersey, Wiley, p.305-339, 2009.

PICCOLO, A.; NARDI, S.; CONCHERI, G. Micelle-like conformation of humic substances as revealed by size exclusion chromatography. **Chemosphere**, [s.l.], v.33, n.4, p.595-602, 1996.

PRIMO, D. C.; MENEZES R. S. C.; SILVA, T. O. Substâncias húmicas da matéria orgânica do solo: uma revisão de técnicas analíticas e estudos no nordeste brasileiro. **Scientia Plena**, v.7, n.5, 2011.

ROSA, M. C. et al. Efeito de substâncias húmicas na cinética de absorção de potássio, crescimento de plantas e concentração de nutrientes em *Phaseolus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.33, n.4, 2009.

SILVA, R. M.; JABLONSKI, A.; SIEWERDT, P. S. J. Desenvolvimento das raízes do Azevém cultivado em solução nutritiva completa, adicionada de substâncias húmicas, sob condições de casa de vegetação. **Revista brasileira de Zootecnia**, p.1623-1631, 2000.

SILVA, A. C. et al. Promoção do crescimento radicular de Plântulas de tomateiro por substâncias Húmicas isoladas de turfeiras. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.35, n.5, p.1609-1617, Viçosa, AL, 2011.

SILVA, J. R. et al. Carbon in Humic Fractions of Organic Matter in Soil Treated with Organic Composts under Mango Cultivation. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.40, p.1-11, 2016.

SOUZA FILHO, P. R. M.; MORAES, M. C.; SIMABUKURO, E. A. Quebra da dormência em *Chloroleucon dumosum* (Benth) G.P. Lewis. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl. 2, p.33-35, Porto Alegre, 2007.

## ASPECTOS ECOLÓGICOS DA POLINIZAÇÃO DE *Ruellia asperula* (MART. EX NEES) LINDAU EM ÁREAS DE CAATINGA SUBMETIDAS A DIFERENTES MANEJOS

Data de aceite: 01/07/2020

Data de submissão: 06/05/2020

### **Breno Costa Figueiredo**

Faculdade de Educação, Ciências e Letras de  
Iguatu - FECLI/UECE  
Iguatu-CE

<http://lattes.cnpq.br/3052661953293631>

### **Mikael Alves de Castro**

Faculdade de Educação, Ciências e Letras de  
Iguatu - FECLI/UECE  
Iguatu-CE

<http://lattes.cnpq.br/7376147239040908>

### **Sabrina Silva Oliveira**

Faculdade de Educação, Ciências e Letras de  
Iguatu - FECLI/UECE  
Iguatu-CE

<http://lattes.cnpq.br/3727983781129553>

### **Gabrielle Kathelin Martins da Silva**

Faculdade de Educação, Ciências e Letras de  
Iguatu - FECLI/UECE  
Iguatu-CE

<http://lattes.cnpq.br/9344234816144229>

### **Ana Carolina Sabino de Oliveira**

Universidade Federal Rural de Pernambuco -  
UFRPE  
Recife-PE

<http://lattes.cnpq.br/8086954389063414>

### **Mychelle de Sousa Fernandes**

Faculdade de Educação, Ciências e Letras de  
Iguatu - FECLI/UECE  
Iguatu-CE

<http://lattes.cnpq.br/2482648379638505>

### **Jefferson Thiago Souza**

Faculdade de Educação, Ciências e Letras de  
Iguatu - FECLI/UECE  
Iguatu-CE

<http://lattes.cnpq.br/5589855068988374>

**RESUMO:** A Caatinga passa por um intenso processo de degradação ambiental, motivado principalmente pelos avanços da pecuária. Dentro de vários processos naturais que ocorrem nesse bioma está a polinização, um importante processo de interação entre planta e animal, que determina a reprodução e propagação de todas as espécies de plantas. O presente estudo busca entender como o manejo da terra afeta as variáveis da polinização, desde a modificação de características vegetais até a possível alteração da guilda de visitantes e potenciais polinizadores. O estudo foi realizado em três microbacias de diferentes manejos. A primeira área está conservada há cerca de 40 anos, na segunda área foi realizado o raleamento de plantas com caule inferior a 10 cm e, por último, a terceira área que teve sua mata nativa

desmatada, queimada e plantado capim. Foram escolhidos 20 indivíduos de *Ruellia asperula* em cada área de manejo, respeitando um distanciamento mínimo de cinco metros entre os indivíduos. Nestes foram feitas medições das partes reprodutivas e vegetativas, como também foram realizadas 104 horas de observação. Para analisar os dados, foram feitos testes de Análise de Variância Multivariada (GLM/MANOVA). Quando analisado o manejo isoladamente, este não apresentou influência sobre os aspectos investidos, enquanto que algumas características da planta pode influenciar diretamente no tipo de polinizador.

**PALAVRAS-CHAVE:** Síndromes de Polinização; Áreas modificadas; Atributos florais.

## ECOLOGICAL ASPECTS OF THE POLLINATION OF *Ruellia asperula* (MART. EX NEES)

### LINDAU IN CAATINGA AREAS SUBMITTED TO DIFFERENT MANagements

**ABSTRACT:** The Caatinga is undergoing an intense process of environmental degradation, motivated mainly by advances in livestock. Within several natural processes that occur in this biome is pollination, an important process of interaction between plant and animal, which determines the reproduction and propagation of all plant species. The present study seeks to understand how land management affects pollination variables, from the modification of plant characteristics to the possible alteration of the guild of visitors and potential pollinators. The study was carried out in three microbasins of different managements. The first area has been conserved for about 40 years, in the second area, thinning of plants with a stem of less than 10 cm was carried out, and finally, the third area that had its native forest cleared, burned and grass planted. Twenty individuals from *Ruellia asperula* were chosen in each management area, respecting a minimum distance of five meters between the individuals. In these, measurements of the reproductive and vegetative parts were made, as well as 104 hours of observation. In order to analyze the data, Multivariate Analysis of Variance (GLM / MANOVA) tests were performed. When the management was analyzed in isolation, it had no influence on the aspects invested, while some characteristics of the plant can directly influence the type of pollinator.

**KEYWORDS:** Pollination Syndromes; Modified areas; Floral attributes.

## 1 | INTRODUÇÃO

O bioma caatinga é um território que sofreu bastante degradação ao longo dos anos através do uso irregular e insustentável dos seus recursos naturais, como desmatamentos indiscriminados, a criação de gado extensivamente, utilização de pastos melhorados e cultura de plantas forrageiras (ALVES; ARAÚJO; NASCIMENTO, 2009). Um manejo bastante praticado nesta região é o desmatamento e queima da mata para a formação de pastagens, em que tal tratamento vem causando fortes degradações ao ambiente, comprometendo os recursos hídricos, compactação do solo, redução da diversidade biológica, entre outros (ALVES; ARAÚJO; NASCIMENTO, 2009).

Outro manejo utilizado, porém pouco praticado nesta região é o raleamento, técnica que permite uma redução nos prejuízos do uso da terra, que consiste na seleção de corte das espécies indesejáveis, reduzindo a cobertura vegetal e permitindo a entrada de raios solares, que nos períodos chuvosos facilitará a germinação e o desenvolvimento de plantas herbáceas para forrageamento (PEREIRA FILHO et al., 2013; ARAÚJO NETO et al., 2013).

A fragmentação dos ambientes podem afetar os diferentes processos existentes, dentre eles, a biologia reprodutiva das plantas. Ashworth et al., (2004) propõe que a biologia reprodutiva de plantas especializadas é mais afetada pela fragmentação do que as plantas generalistas, onde essas plantas generalistas são polinizadas por muitos polinizadores, enquanto plantas especializadas são polinizadas por um ou alguns polinizadores especializados. Dessa forma, estudos sobre interação planta-polinizador em ambientes fragmentados, são essenciais para indicar medidas de preservação, tendo em vista que áreas degradadas podem interromper as interações planta-polinizador (CHI; MOLANO-FLORES, 2015) afetando a polinização das plantas, principalmente de plantas especializadas.

A espécie do presente estudo, *Ruellia asperula*, é uma planta herbácea que apresenta flor de cor vermelha, zigomorfa, tendo néctar como recurso (RCPol, 2020). As características dessa planta indicam que são polinizadas efetivamente por beija-flores, onde o pólen é depositado no bico ou no topo da cabeça do polinizador (BUZATO et al., 2000). Diante disso, compreender como ocorre o processo de polinização nessa espécie, além de identificar outros visitantes, quando influenciados pelo ambiente, podem dar fortes indicativos de medidas para controle ambiental.

Destacado todas essas características, surgem as seguintes perguntas: 1) O manejo afeta a biologia reprodutiva das plantas? e 2) Tais mudanças influenciam a relação planta-animal no processo de polinização, fundamental para a conservação dos ecossistemas naturais? Dessa forma, o presente estudo busca entender se o manejo da terra no Bioma Caatinga tem efeito nas variáveis da polinização, tanto nas características vegetais, como na guilda de visitantes e potenciais polinizadores.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

### A. Área de estudo

A pesquisa foi realizada na bacia experimental de Iguatu pertencente ao Instituto Federal do Ceará (IFCE) – Campus Iguatu, na região Centro Sul do Ceará, entre as coordenadas geográficas 6° 23' 42" a 6° 23' 47" S e 39° 15' 24" a 39° 15' 29" W na qual é composta por três microbacias de 1 a 3 ha cada, sendo uma área conservada, uma raleada e outra destinada ao cultivo de pastagem para alimentação animal.

A primeira microbacia (Caatinga Conservada - CC), enquadrada como caatinga arbustivo-arbórea fechada, é uma área conservada a cerca de 40 anos, conforme relato dos moradores das áreas próximas (SOUSA et al., 2016). A segunda microbacia (Caatinga Raleada - CR) se trata de uma área raleada, onde foram mantidas espécies vegetais com diâmetro igual ou superior a 10 cm, tendo sido retiradas todas as espécies com diâmetro de caule inferior a isto. O tratamento foi aplicado no início de novembro de 2008 e as manutenções foram feitas nos meses de dezembro de 2010 e dezembro de 2012 (SOUSA et al., 2016). A terceira microbacia (Desmatada, Queimada e submetida a Pastagem - DQP), compreende uma área em que toda a vegetação foi retirada, em seguida submetida à queima e ao cultivo de capim (*Andropogon gayanus* Kunt). Tais processos ocorreram no ano de 2009 e a roçagem da gramínea ocorrendo nos finais do ano de 2010 e 2011 (PALÁCIO et al., 2019), mantendo a cobertura de capim nos anos seguintes. O relevo é suave ondulado e o solo pouco profundo e pedregoso. Em épocas secas o solo se contrai, e em épocas chuvosas, por sua forma plástica, facilmente se encharca (LOPES et al., 2010). O solo da microbacia foi classificado como Vertissolo Ebânico Carbonático Típico de acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (EMBRAPA, 2013).

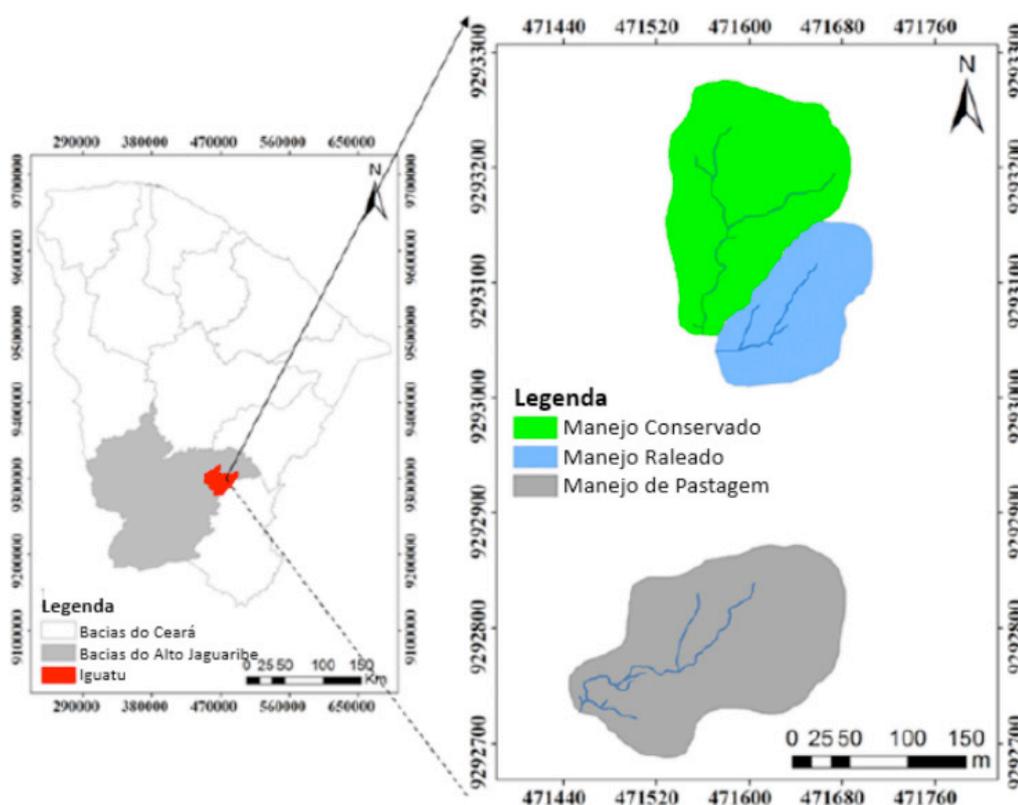


Figura 1: Localização das áreas de estudo (PALÁCIO,2016) Adaptado.

## B. Espécie estudada

*Ruellia asperula* é uma espécie da família Acanthaceae, nativa e endêmica do Brasil,

presente principalmente na região Nordeste, no domínio da Caatinga (FLORA DO BRASIL, 2020). É conhecida popularmente como “melosa” e sua floração ocorre no mês de julho, produzindo inflorescências com flores vermelhas, bissexuadas e de antese diurna (Figura 2). Além disso, as flores contêm néctar como principal recurso e têm um formato de tubos longos (RCPol, 2020).

Deste modo, a arquitetura floral determina os seus visitantes, sendo adaptada para a polinização por pássaros, principalmente os beija-flores, que possuem bicos longos e finos que conseguem alcançar o recurso e também realizar a polinização da espécie ao tocar a sua testa nas partes reprodutivas masculinas (TRIPP; MANOS, 2008).



Figura 2: Inflorescência de *Ruellia asperula*.

### C. Amostragem

Foram escolhidos 20 indivíduos de *R. asperula* distribuídos em cada manejo estudado, respeitando um espaçamento mínimo de cinco metros entre os indivíduos. Para observação de visitas, foi realizada a observação focal da planta em intervalos de uma hora. Obtivemos 48 horas de observação em cada manejo, totalizando 104 horas, sendo estas realizadas durante o dia, das 07h00 às 11h00 e das 13h00 às 17h00. Para auxiliar na identificação dos visitantes, foi utilizado o registro fotográfico das espécies.

Além disso, foram feitas medidas dos atributos florais como comprimento da corola, anteras, estiletes, abertura e diâmetro da corola, com auxílio de um paquímetro. Ainda foram mensuradas, partes vegetativas como altura e diâmetro da base das plantas, sendo o último tomado por referência a área imediatamente acima do solo.

#### D. Análise de dados

Para verificar o efeito dos manejos nos aspectos ecológicos da polinização, foi utilizada a Análise de Variância Multivariada (GLM/MANOVA), com teste de significância multivariado de Traço de Pillai ( $p \leq 0,05$ ). A comparação das médias foi feita com correção de Bonferroni com probabilidade ajustada, como recomendado para testes múltiplos (Gotelli & Ellison, 2011). Os testes estatísticos foram realizados através do pacote Statistica 7.0.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O manejo isoladamente não teve influência nas características mensuradas, tanto da estrutura floral quanto no processo de polinização, como o comprimento da corola, que não teve diferença significativa entre as áreas ( $F = 10,214$ ;  $p > 0,001$ ) (Figura 3). Isso pode ser atribuído ao fato de que a *Ruellia asperula* apresenta atributos que possuem associação com suas síndromes florais, sendo estas a ornitofilia e psicofilia, como definido por Faegri e van der Pijl (1979), e portanto não apresentando variação entre diferentes áreas.

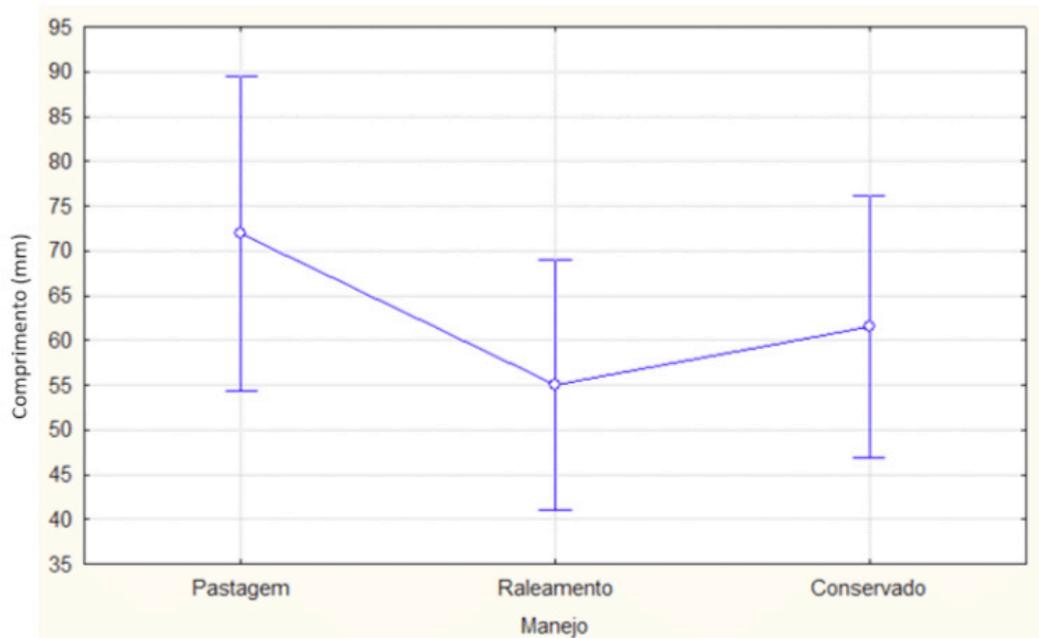


Figura 3: Comprimento da corola de *Ruellia asperula* nos diferentes manejos

Foi possível notar que a abertura da corola influencia diretamente na interação planta-animal afetando o número de visitas, tipo de visitante e o tipo de comportamento. Isso se deve ao fato de que flores com corolas tubulares, como é o caso de *R. asperula*, são mais propícias à visitas por animais com aparelhos bucais mais

longos e finos para um melhor acesso ao recurso em espaços estreitos, o que torna as visitas complicadas para animais com aparelho bucal curto (ALVES-DOS-SANTOS et al., 2016). Desta forma, para ter acesso ao recurso floral de flores tubulares são necessários morfologia e dimensões corporais adequadas (PINHEIRO, et al., 2014; SHIMIZU, 2014).

O número de flores por planta não afetou o número de visitas, mas influenciou na duração destas pelos visitantes florais. Esse tipo de comportamento dos visitantes florais pode ser explicado pelas estratégias do forrageamento ótimo, onde os animais procuram equilibrar o tempo e a energia gasta durante o forrageio com a quantidade de recurso ou recompensa obtida (TOWNSEND; BEGON; HARPER, 2010). Assim, os indivíduos buscam obter a maior quantidade possível de alimento em um mesmo ponto, utilizando o menor tempo e energia possível (RICKLEFS, 2009). Desta forma, baseando-se nesta teoria, uma vez estando numa planta com maior número de flores, o visitante opta por visitar todas ou a maioria delas para extrair o máximo de recurso disponível sem ter que se desgastar visitando outros indivíduos mais distantes.

Sobre o tipo de visitantes foi verificado um predomínio de borboletas em ambas as áreas, embora tenha se observado uma elevada ocorrência de pilhagem por parte destas que aproveitavam a perfuração feita por uma espécie de abelha do gênero *Bombus* para ter acesso ao néctar presente na base da corola. Esse tipo de comportamento onde abelhas perfuram a corola para acessar o recurso sem tocar as estruturas reprodutivas da flor também foi encontrado por Sigrist e Sazima (2002) no estudo realizado com *Ruellia brevifolia*.

Quanto a porcentagem de visitas por beija-flores, não houve variação entre a DQP e a CR, no entanto mostrou aumento significativo na CC, o que pode estar relacionado às diferentes condições ambientais entre as áreas observadas, tendo em vista que tais diferenças promovem também modificações nos habitats o que influencia em vários aspectos ecológicos, entre eles a interação entre plantas e polinizadores (MATTHIES; SCHMID; SCHMID-HEMPEL, 1995; STEFFAN-DEWENTER; TSCHARNTKE, 1999). Em se tratando de aves, estas são altamente afetadas por práticas antrópicas (ALVES; ARAÚJO; NASCIMENTO, 2009), o que poderia estar relacionado com o menor número de visitas a DQP e CR.

Quanto ao horário de visitas, foi possível perceber uma concentração nas áreas DQP e CR no horário de 08:00 às 10:00, com pico próximo ao final desse período e posterior diminuição ao longo do dia. Locatelli e colaboradores (2004) observaram também em seu estudo um pico de visitas de beija-flores entre 09:00 e 13:00 e destacaram que os indivíduos realizavam visitas em linhas de captura com regularidade mediana, provavelmente devido à quantidade de néctar insuficiente. Mesmo não sendo os visitantes predominantes, beija-flores foram registrados em *Ruellia asperula*, e sobre as possíveis visitas em linhas de captura Feinsinger e Colwell (1978) afirmam que alguns beija-flores podem transitar entre as linhas de captura e a territorialidade, dividindo temporariamente suas funções. Nessas

áreas também foi notado a ausência de visitas no período de 15:00 às 16:00, coincidindo com o período de temperaturas mais elevadas durante o dia.

Em paralelo, a CC registrou visitas em todos os horários de observação atingindo dois picos: o primeiro coincidindo com as outras áreas e o segundo no período de 15:00 as 16:00, embora este estudo indique que o manejo não afetou o horário de visitas ( $F=10,214$ ;  $p > 0,001$ ), logo estudos posteriores podem determinar quais fatores levaram a essas diferenças (Figura 4).

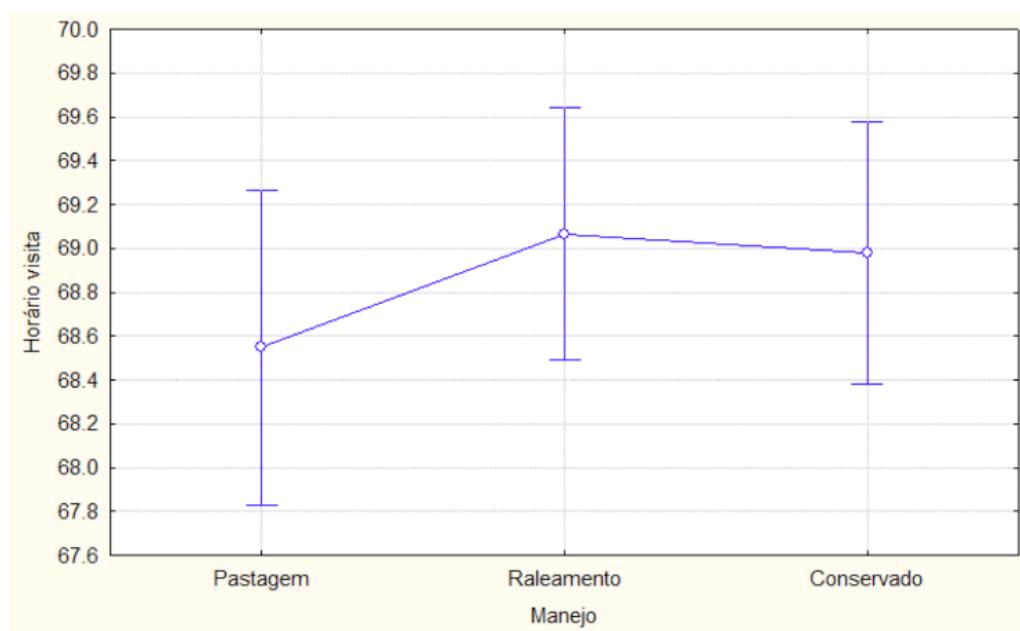


Figura 4: Horários de visitas florais em *Ruellia asperula* nos diferentes manejos

## 4 | CONCLUSÃO

Portanto, os dados obtidos nesta pesquisa não encontraram influência do manejo nos aspectos ecológicos da polinização de *Ruellia asperula*. Estudos posteriores podem demonstrar se efetivamente não afeta, ou se associado com outras características pode então influenciar. Limitações como horário de observação, associado ao fato de já estarem ocorrendo visita pelos polinizadores, bem como o número reduzido de amostras podem alterar os dados coletados.

## REFERÊNCIAS

- ALVES JUNIOR, F. T.; FERREIRA, R. L. C.; DA SILVA, J. A. A.; MARANGON, L. C.; CESPEDES, G. H. G. **Natural regeneration of an area of Caatinga vegetation in Pernambuco state, northeastern Brazil.** *Cerne*, v. 19, n. 2, p. 229–235, 2013.
- ALVES, J. J. A.; ARAÚJO, M. A.; NASCIMENTO, S. S. **Degradação da Caatinga: uma investigação ecogeográfica.** *Revista Caatinga*, v. 22, n. 3, 2009

ALVES-DOS-SANTOS, I. et al. **Quando um visitante floral é um polinizador?**. Rodriguésia, v. 67, n. 2, p. 295-307, 2016.

ARAÚJO NETO, J. R. et al. **Análise comparativa do escoamento superficial de microbacias experimentais em clima semiárido tropical**. Water Resources and Irrigation Management-WRIM, v. 2, n. 3, p. 111-120, 2013.

ASHWORTH, L. et al. **Why do pollination generalist and specialist plant species show similar reproductive susceptibility to habitat fragmentation?**. Journal of Ecology, v. 92, n. 4, p. 717-719, 2004.

BUZATO, S.; SAZIMA, M.; SAZIMA, I.. **Hummingbird-Pollinated Floras at Three Atlantic Forest Sites 1**. Biotropica, v. 32, n. 4b, p. 824-841, 2000.

CHI, K.; MOLANO-FLORES, B. **A degradação do habitat interrompe as interações planta-polinizador para uma planta rara auto-compatível**. Plant Ecology, v. 216, n. 9, p. 1275-1283, 2015.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 3ed. 353p. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2013.

FAEGRI, K.; VAN DER PIJL, L. **The principles of pollination ecology**. Oxford.: Pergamon Press, 1979.

FEINSINGER, P.; COLWELL, R. K. **Community organization among neotropical nectar-feeding birds**. American Zoologist, v. 18, n. 4, p. 779-795, 1978.

GOTELLI, N.; ELLISON, A.M. **Princípios de estatística em ecologia**. ArtMed. 2011

LOCATELLI, E.; MACHADO, I. C.; MEDEIROS, P. **Saranthe klotzschiana (Koer.) Eichl. (Marantaceae) e seu mecanismo explosivo de polinização**. Brazilian Journal of Botany, v. 27, n. 4, p. 757-765, 2004.

LOPES, J. F. B. et al. **Deposição e decomposição de serapilheira em área da Caatinga**. Revista Agro@mbiente on-line, v. 3, n. 2, p. 72-79, 2010.

MATTHIES, D.; SCHMID, B.; SCHMID-HEMPEL, P. **A importância dos processos populacionais para a manutenção da diversidade biológica**. Perspectivas ecológicas da GAIA para a ciência e a sociedade, v. 4, n. 4, p. 199-209, 1995.

PALÁCIO, H. A. Q et al. **Dinâmica sazonal da produção de biomassa herbácea em área de gramínea no semiárido do Brasil**. Conexões-Ciência e Tecnologia, v. 13, n. 5, p. 99-104, 2019.

PALÁCIO, H. A. Q. et al. **Effective precipitation, soil loss and plant cover systems in the Caatinga biome, Brazil**. Revista Caatinga, v. 29, n. 4, p. 956-965, 2016.

PEREIRA FILHO, J. M.; SILVA, A. M. A.; CÉZAR, M. F. **Manejo da Caatinga para produção de caprinos e ovinos**. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, v. 14, 2013.

PINHEIRO, M. et al. **Polinização por abelhas** IN: RECH, AR; AGOSTINI, K.; OLIVEIRA, PE; MACHADO, IC (Org.). Biologia da polinização. Rio de Janeiro: Ed. Projeto Cultural, p. 205-233, 2014.

**Rede de catálogos polínicos online**. disponível em: < <http://chaves.rcpol.org.br/> >. acesso em: 04 de abril de 2020

RICKLEFS, R. E. **Adaptação à vida em ambientes variantes**. In: RICKLEFS, R. E. A economia da natureza. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 168-184 p. 2009.

Ruellia in Flora do Brasil 2020 em construção. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB15363>>. Acesso em: 27 abr. 2020.

SHIMIZU, A. et al. **Fine-tuned bee-flower coevolutionary state hidden within multiple pollination interactions**. Scientific Reports, v. 4, p. 3988, 2014.

SIGRIST, M. R.; SAZIMA, M. **Ruellia brevifolia (Pohl) Ezcurra (Acanthaceae): fenologia da floração, biologia da polinização e reprodução**. Brazilian Journal of Botany, v. 25, n. 1, p. 35-42, 2002.

SOUSA, M. M. M. et al. **Influência do manejo da vegetação em microbacias hidrográficas e suas respostas hidrossedimentológicas**. REVISTA EQUADOR, v. 5, n. 4, p. 43-55, 2016.

STEFFAN-DEWENTER, I.; TSCHARNTKE, T. **Effects of habitat isolation on pollinator communities and seed set**. Oecologia, v. 121, n. 3, p. 432-440, 1999.

TOWNSEND, C. R.; BEGON, M.; HARPER, J. L. **Fundamentos em ecologia**. Porto Alegre: Artmed. 248-284 p. 2010.

TRIPP, E. A.; MANOS, P. S. **Is floral specialization an evolutionary dead-end? Pollination system transitions in Ruellia (Acanthaceae)**. Evolution: International Journal of Organic Evolution, v. 62, n. 7, p. 1712-1737, 2008.

## PLANTAS TÓXICAS ENCONTRADAS NOS PASTOS DA FAZENDA ESCOLA DO CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA DO UNIFESO, TERESÓPOLIS/RJ

Data de aceite: 01/07/2020

### Lucas Cavalcante de Moura

Centro Universitário Serra dos Órgãos

Teresópolis - Rio de Janeiro

<http://lattes.cnpq.br/2355748327403319>

### Luciana Cavalcante de Moura

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy

Ribeiro

Campos dos Goytacazes – Rio de Janeiro

<http://lattes.cnpq.br/2852782538420244>

### Fernanda Stefany Nunes Costa

Museu Nacional/ Universidade Federal do Rio de Janeiro

Quinta da Boa Vista – Rio de Janeiro

<http://lattes.cnpq.br/2802579204931525>

### George Azevedo de Queiroz

Museu Nacional/ Universidade Federal do Rio de Janeiro

Quinta da Boa Vista – Rio de Janeiro

<http://lattes.cnpq.br/0630063471814151>

### André Vianna Martins

Centro Universitário Serra dos Órgãos

Teresópolis - Rio de Janeiro

<http://lattes.cnpq.br/8293134870661505>

**RESUMO:** As plantas tóxicas causam grandes prejuízos na pecuária, sendo responsáveis por cerca de 7% a 15% das mortes desses

animais. O objetivo deste estudo foi identificar na área de pastagem do Campus Quinta do Paraíso do Centro Universitário da Serra dos Órgãos (Unifeso) possíveis espécies tóxicas que possam causar danos à saúde de bovinos, equinos e caprinos. Foi realizada coleta no mês de maio de 2019 no Campus Quinta do Paraíso - Unifeso (22°23'35"S - 42°57'65"O). O material foi herborizado e depositado no herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RB). A identificação foi feita com base na literatura específica e com o auxílio dos botânicos. A designação como planta tóxica foi confirmada a partir de referências para cada táxon. Foram identificadas seis espécies consideradas tóxicas no pasto do campus: *Amaranthus spinosus* L., *Lantana camara* L., *Nicandra physalodes* (L.) Gaertn., *Ricinus communis* L., *Sida planicaulis* Cav., *Solanum viarum* Dunal. Destas, *S. viarum* apresentou grande número de indivíduos, constituindo risco para os animais ali presentes. Conclui-se que é necessário o controle dessas espécies tóxicas, em especial, *S. viarum* que se encontra com população numerosa. Além disso, esta pesquisa fornece subsídios, como breves descrições e fotos das plantas, que permitem o reconhecimento destas espécies.

**PALAVRAS-CHAVE:** Intoxicação por plantas; Inventário; Pastagem.

## TOXIC PLANTS FOUND IN THE PASTURES OF THE FARM SCHOOL OF THE VETERINARY MEDICINE COURSE OF UNIFESO, TERESÓPOLIS / RJ

**ABSTRACT:** The toxic plants cause great losses in livestock, being responsible for 7% to 15% of the animals death. The objective of this study was to identify in the pasture area of Quinta do Paraíso Campus of Centro Universitário Serra dos Órgãos (Unifeso) potential toxic species that may cause health injury to bovine, equine and caprine. The gathering was made in March 2019, in Quinta do Paraíso Campus, of Unifeso (22°23'35"S - 42°57'65"O). The material was herborizad and held in Jardim Botânico of Rio de Janeiro herbarium. The recognition was based in specific literature and with botanical assistance. The designation as a toxic plant was confirmed from references for each taxon. Six species were identified as toxic in the Campus pasture: *Amaranthus spinosus* L., *Lantana camara* L., *Nicandra physalodes* (L.) Gaertn., *Ricinus communis* L., *Sida planicaulis* Cav., *Solanum viarum* Dunal. Of these, *S. viarum* presentes a large number of individuals, composing risk to the animals there. Concludes that it is necessary to control these species, specifically *S. viarum*, that were found in large population. Beyond that, this research provides resources, as brief descriptions and photos of the plats, allowing these species recognition.

**KEYWORDS:** Intoxication by plants; Inventory; Pasture.

### 1 | INTRODUÇÃO

A pecuária é uma importante atividade econômica no Brasil, sendo considerado um dos maiores produtores mundiais de carne bovina (GOMES *et al.*, 2017). As pastagens representam a forma mais economicamente viável para a alimentação de ruminantes, ocupando cerca de 172 milhões de hectares do território brasileiro (IBGE, 2009; OLIVEIRA e SILVA, 2018). O Estado do Rio de Janeiro possui quase a metade de sua área (47,2%) formada por pastos, o que mostra o potencial para criação de bovinos, caprinos, equinos e ovinos (IBGE, 2016).

A principal fonte de nutrientes para os ruminantes está presente nas pastagens. As forragens fornecem proteína, energia, além da fibra que é um componente importante para promover a mastigação, ruminação e saúde do animal (TEIXEIRA e ANDRADE, 2001). O manejo e qualidade do pasto influencia diretamente no nível de produção de vacas leiteiras e gado de corte (DIAS-FILHO, 2016; SILVA e MAIXNER, 2016).

As plantas tóxicas são definidas como todo vegetal que ao ser introduzido no organismo do homem ou de animais, em condições naturais, pode causar danos à saúde, podendo até mesmo levar a óbito (HARAGUCHI, 2003). No Brasil, são conhecidas cerca de 130 espécies de plantas tóxicas com interesse pecuário (PESSOA *et al.*, 2013).

Estas plantas geram prejuízos econômicos na pecuária tanto de forma direta,

relacionado a morte do animal ou ainda em caso de baixo índice produtivo, ou indiretamente, com gastos com medidas para evitar a intoxicação e tratamento de animais já contaminados (RIET-CORREA & MEDEIROS, 2001; RIET-CORREA e MENDÉZ, 2007).

As intoxicações por plantas são as causas mais frequentes de mortes súbitas a bovinos em todo o Brasil, o que gera grandes prejuízos em animais de produção na pecuária (CARVALHO *et al.*, 2009; ESTIMA-SILVA *et al.*, 2016). Em geral, os animais que ingerem essas plantas morrem de maneira repentina, sem sinais clínicos prévios, ou com sintomas que passam despercebidos, o que dificulta o atendimento aos animais após intoxicação (HELAYEL *et al.*, 2009).

Devido à falta de dados, o número de intoxicação por plantas em animais é subestimado. No entanto, com base em pesquisas de laboratórios veterinários estima-se que entre 7% e 15% das mortes do gado sejam causadas por essas plantas (RIET-CORREA e MEDEIROS, 2001; PESSOA *et al.*, 2013).

Desse modo, estudos de inventários de espécies tóxicas na pastagem são necessários, uma vez que, auxiliam no reconhecimento dessas plantas, possibilitando o manejo e o controle das mesmas. Tendo esse trabalho como objetivo principal, a identificação de espécies tóxicas que possam causar danos à saúde de bovinos, equinos e caprinos presentes nas áreas de pastagem do Campus Quinta do Paraíso do Centro Universitário da Serra dos Órgãos.

## 2 | METODOLOGIA

Para o levantamento de dados foi realizada, no mês de maio de 2019, uma verificação nas áreas de pastagens dos animais da Fazenda escola do Curso de Medicina Veterinária, localizado no Campus Quinta do Paraíso, Centro Universitário da Serra dos Órgãos (22°23'35"S - 42°57'65"O) (Figura 1). As plantas registradas no local foram coletadas e herborizadas segundo técnicas usuais de coletas botânicas e depositadas no herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RB).

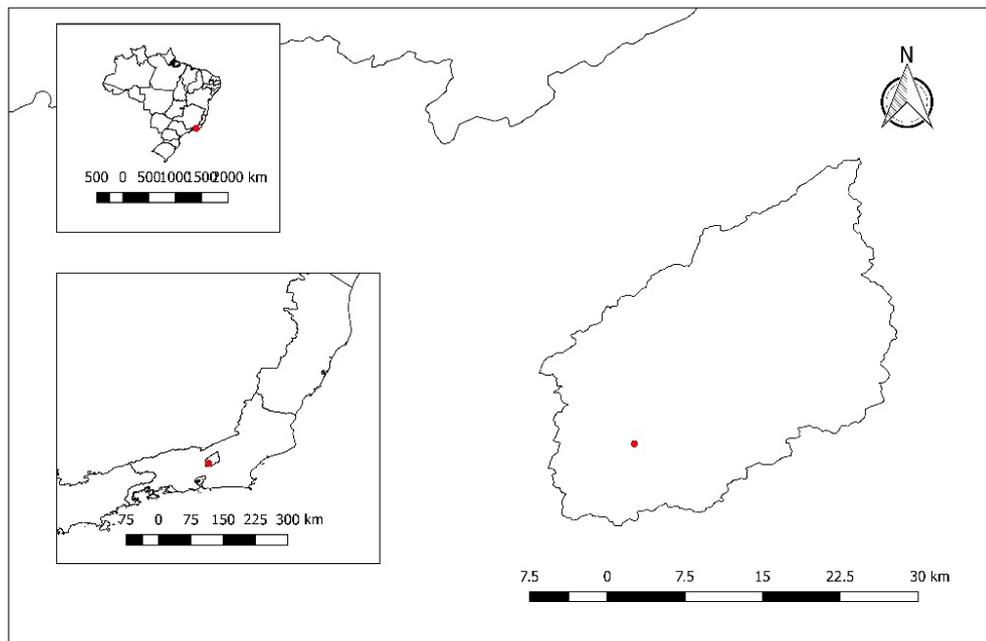


Figura 1: Mapa de localização do Centro Universitário da Serra dos Órgãos, Fazenda escola do Curso de Medicina Veterinária, localizado no Campus Quinta do Paraíso, Teresópolis, RJ.

A identificação do material foi feita através de literatura específica utilizada em botânica. A designação como planta tóxica foi confirmada a partir de referência especializada para cada táxon. Para todas as espécies encontradas foram apresentadas informações como: o nome popular, a parte tóxica da planta, uma breve descrição e os sintomas causados pela intoxicação, além de fotos.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificadas seis espécies consideradas tóxicas nos pastos do Campus Quinta do Paraíso do Centro Universitário da Serra dos Órgãos: *Amaranthus spinosus* L., *Lantana camara* L., *Nicandra physalodes* (L.) Gaertn. *Ricinus communis* L., *Sida planicaulis* Cav., *Solanum viarum* Dunal.

#### 3.1 *Amaranthus spinosus* L.

Figura 2B

Nome Popular: Caruru-de-espinho, caruru-de-porco, bredo-branco, bredo-vermelho, bredo-de-espinho, bredo-de-santo-antônio.

Caracterização: Erva, ereta ou semi-prostada, 0,5-1,0 m comp., com espinhos. Caule avermelhado a verde escuro, glabro na base pubescente no ápice. Folhas alternas, oblongo-lanceoladas, margem inteira e levemente ondulada. Inflorescência em panículas, unissexuais, monoclamídeas, flores de 1,5-2,0 mm compr., verde-pálida a róseas. Fruto alongado, cor de palha. Semente obovada (ligeiramente alongada), castanho escuro a

preto (GROTH, 1983; LORENZI, 1982; LORENZI, 1990).

Parte da Planta: não descrito na literatura.

Sintomas: Dispneia, hálito urêmico, dificuldades de locomoção, redução dos reflexos, nefrose tubular tóxica, metemoglobinemia, podendo levar a morte (bovinos, caprinos e ovinos) (PEIXOTO *et al.*, 2003).

### 3.2 *Lantana camara* L.

Figura 2C

Nome Popular: Camará, chumbinho, camará-de-cheiro, camará-de-chumbo, camará-de-espinho, lantana.

Caracterização: Arbusto, ereta, 0,80 - 1,20 m compr., com acúleos. Caule verde a marrom. Folhas opostas, oval a elíptica, margem crenada. Inflorescência dispostas em capítulos, bissexuais, diclamídea, flores 1,5-2,5 mm compr., multicoloridos. Fruto drupa, roxo escuro ou preto. Semente não vista (MATOS *et al.*, 2011, CARDOSO *et al.*, 2018).

Parte da planta: Folhas in natura ou secas.

Sintomas: Anorexia, icterícia, fotossensibilização nas partes despigmentadas do corpo (provocando vermelhidão), parada dos movimentos do rúmen, glóbulos, emagrecimento, oculares retraídos, febre, fezes ressecadas, urina de coloração escura e no caso mais grave a morte do animal (bovinos, ovinos e caprinos) (TOKARNIA *et al.*, 1999; MATOS *et al.*, 2011).

### 3.3 *Nicandra physalodes* (L.) Gaertn.

Figura 2D

Nome Popular: Quintilho, joá-de-capote, bexiga, balãozinho, lanterna-da-china.

Caracterização: Subarbusto, ereto, ca. 1,0 m compr., sem espinhos ou acúleos. Caule verde, glabra. Folhas alternas, glabra, elíptica a oval, margem sinuosa a dentada. Flores solitárias, bissexuais, diclamídea, 20,0-22,0 mm compr., lilases e brancas. Fruto baga, globosa, inflada, marrom. Semente subdiscóide, ferrugínea a marrom (SILVA e AGRA, 2005).

Parte da Planta: não descrito na literatura.

Sintomas: não descrito na literatura.

### 3.4 *Ricinus communis* L.

Figura 2E

Nome Popular: Mamona, rícino, carrapateira, palma-de-cristo.

Caracterização: Arbusto, ereta, 2,0-3,0 m de altura, sem espinhos nem acúleos. Caule verde ou marrom, glabro. Folhas alternas, palmatilobada, margem serreada. Inflorescência em racemos, flores masculinas na parte inferior e femininas na superior, monoclamídea, flores de 5,0-8,0 mm compr., amarelas. Fruto cápsula externamente espiniforme, verde.

Semente oval, castanha, manchada por estrias brancas (LORENZI, 1982; MATOS *et al.*, 2011).

Parte da Planta: Folhas e frutos.

Sintomas: Inquietação, andar desequilibrado, anorexia, diarreia, fraqueza, tremores musculares, sialorreia, eructação excessiva e em casos mais graves óbito (bovinos) (MATOS *et al.*, 2011).

### 3.5 *Sida planicaulis* Cav.

Figura 2F

Nome Popular: vassourinha, guanxuma, mata-pasto.

Caracterização: Erva, ereta, 0,3-0,5 m, sem espinho nem acúleo. Caule verde a marrom, glabrescente. Folhas alternas dísticas, lanceoladas, margem serrada desde a base. Inflorescência cimosa em glomérulos ou flores solitárias, bissexuais, diclamídea, 7,0-8,0 mm compr., amarelas. Fruto esquizocárpico com duas aristas, marrom. Semente não vista. (FERNANDES-JÚNIOR e KONNO, 2017).

Parte da Planta: não descrito na literatura.

Sintomas: Incoordenação motora, ataxia com dismetria, tremores de cabeça e pescoço, olhar atento, andar cambaleante, quedas frequentes, podendo levar à morte (bovinos, caprinos, equinos, ovinos) (COLODEL *et al.*, 2002).

### 3.6 *Solanum viarum* Dunal

Figura 2G

Nome Popular: Joá, joá-bravo, juá, juá-bravo, arrebenta-cavalo.

Caracterização: Erva, ereta ou decumbente, 0,3-0,5m, com longos acúleos. Caule verde ou marrom, aculeado. Folhas alternas, ovaladas, levemente lobadas, margem lobada. Inflorescência em cimeira, bissexual, diclamídea, flores 7,0-9,0 mm compr., alvas. Frutos globosos, verde com mosaicos brancos quando imaturo e completamente amarelo quando maduros. Semente não vista. (LORENZI, 1982).

Parte da Planta: Frutos.

Sintomas: Possível distúrbio neurológico, tremores de cabeça (caprinos) (PORTER *et al.*, 2003).

## 4 | CONCLUSÃO

Este estudo evidenciou que foram encontradas nos pastos do Campus Quinta do Paraíso do Centro Universitário da Serra dos Órgãos, seis espécies de plantas tóxicas. Dentre elas, *Solanum viarum* é a que representa maior preocupação, tendo em vista sua grande população, aumentando assim, o risco com os animais que ali vivem. As demais

espécies, mesmo em menor frequência, apresentam riscos aos animais, sendo o mais indicado seu manejo da área de pastagem. Neste sentido, os resultados aqui encontrados servem de alerta Centro Universitário da Serra dos Órgãos, bem como, áreas adjacentes quanto a possíveis acidentes com plantas tóxicas.

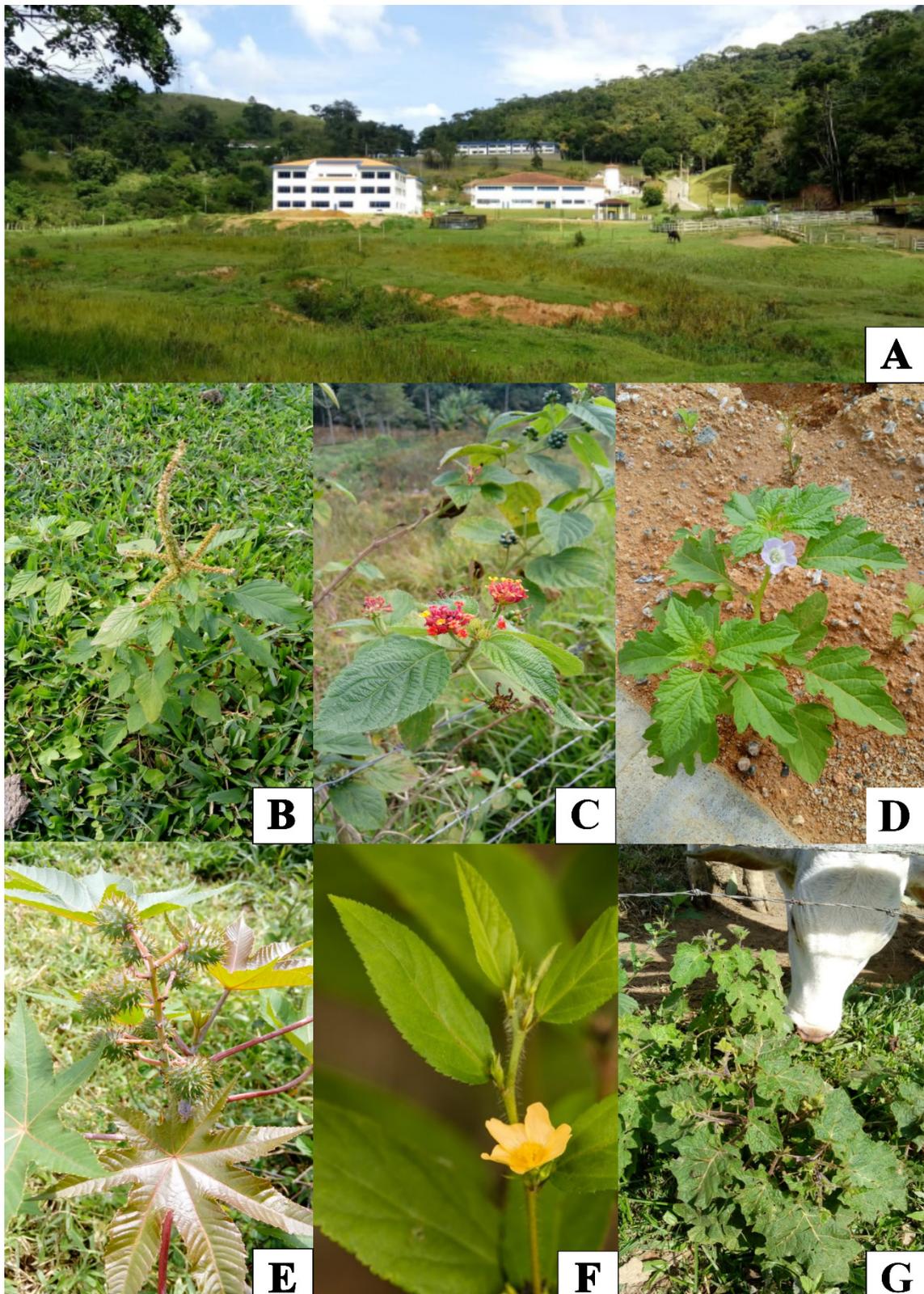


Figura 2: Fotos das espécies de plantas tóxicas encontradas nos pastos da Fazenda Escola de Medicina Veterinária do UNIFESO. A) Pasto do Centro Universitário da Serra dos Órgãos Campus Quinta do Paraíso; B) *Amaranthus spinosus* L.; C) *Lantana camara* L.; D) *Nicandra physalodes* (L.) Gaertn.; E) *Ricinus communis* L.; F) *Sida planicaulis* Cav. (Foto: Keith Bradley); G) *Solanum viarum* Dunal.

## REFERÊNCIAS

- BOVINI, M. G.; CARVALHO-OKANO, R. M.; VIEIRA, M. F. Malvaceae A. Juss. no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil. *Rodriguésia* 52(81): 2001. p17-47.
- CARDOSO, P. H.; CABRAL, A.; FVALÉRIO, V. I. R.; SALIMENA, F. R. G. 2018. Verbenaceae na Serra Negra, Minas Gerais, Brasil. *Rodriguésia* 69 (2): 2018. p. 777 – 786.
- CARVALHO, G.D.; NUNES, L.C.; BRAGANÇA, H.B.N.; PORFÍRIO, L.C. Principais plantas tóxicas causadoras de morte súbita em bovinos no Estado do Espírito Santo. **Archivos de Zootecnia**, v.58, 2009. p. 87-98.
- COLODEL, E.M.; DRIEMEIR, D.; LORETTI A. P.; GIMENO, E.J.; TRAVERSO, S. D.; SEITZ, A. L.; ZLOTOWSKI, P. Aspectos clínicos e patológicos da intoxicação por *Sida carpinifolia* (Malvaceae) em caprinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n. 2, 2002. p. 51-57.
- DIAS-FILHO, M.B.; Uso de Pastagens para a Produção de Bovinos de Corte no Brasil: Passado, Presente e Futuro. Belém: Embrapa Amazônia Oriental; 2016.
- ESTIMA-SILVA, P.; MOLARINHO, K.R.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; SOARES, M.P.; SALLIS, E.S.V.; LADEIRA, S.R.L. & SCHILD, A.L. Morte súbita em bovinos no Sul do Rio Grande do Sul: epidemiologia e diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 1, 2016. p. 19- 23.
- FERNANDES-JÚNIOR, A.J.; KONNO, T.U.P. Malvaceae do Parque Estadual do Ibitipoca, Estado de Minas Gerais, Brasil. **Hoehnea**, São Paulo, v. 44, n. 4, 2017. p. 504-523.
- GOMES, R.C.; FEIJÓ, G.L.D.; CHIARI, L. **Evolução e Qualidade da Pecuária Brasileira**. Campo Grande: Embrapa, 2017.
- GROTH, D.; BOARETTO, M. R.; SILVA, R. N. 1983. Morfologia de sementes, frutos e plantas invasoras em algumas culturas. *Revista Brasileira de Sementes* 5 (3): 1983. p.151-182.
- HARAGUCHI, M. Plantas tóxicas de interesse na pecuária. **Biológico**, São Paulo, v. 65, n. 1/2, 2003. p. 37-39.
- HELAYEL, M.A.; FRANÇA, T.N.; SEIXAS, J.N.; NOGUEIRA, V.A.; CALDA, S.A.; PEIXOTO, P.V. Morte súbita em bovinos causada pela ingestão de *Pseudocalymma elegans* (Bignoniaceae) no município de Rio Bonito, RJ. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v. 29, n. 7, 2009. p. 498-508.
- IBGE. Censo Agropecuário, 2009. Disponível em <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2009/tabela1\\_3\\_7.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2009/tabela1_3_7.pdf)> Acesso em: 25 mai. 2019.
- IBGE. IBGE mapeia a cobertura e o uso da terra no estado do Rio de Janeiro. Geociências, 2016. Disponível em <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/9513-ibge-mapeia-a-cobertura-e-o-uso-da-terra-no-estado-do-rio-de-janeiro>> Acesso em: 25 mai. 2019.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. São Paulo: Nova Odessa, 1982. 425p.
- LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional**. 3. ed. Nova Odessa: Plantarum, 1990. 240 p.
- MATOS, F.J.A.; LORENZI, H.; SANTOS, L.F.L. dos; MATOS, M.E.O.; SILVA, M.G.V.; SOUSA, M.P. **Plantas tóxicas: estudo de fitotoxicologia química de plantas brasileiras**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2011. 247 p.

OLIVEIRA, G.N.S.; SILVA, G. F. Aspectos tóxicos da *Brachiaria* em animais de produção. In: SIMPÓSIO DE TCC, 14. e SEMINÁRIO DE IC DA FACULDADE ICESP, 7. Anais [...] São Paulo: ICESP, 2018. p. 1477-1484.

PEIXOTO, P.V.; BRUST, L.A.C.; BRITO, M.F.; FRANÇA, T.N.; CUNHA, B.R. M.; ANDRADE, G.B. Intoxicação natural por *Amaranthus spinosus* (Amaranthaceae) em ovinos no Sudeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 4, 2003. p. 179-184.

PESSOA, C.R.M.; MEDEIROS, R.M.T.; RIET-CORREA, F. Importância econômica, epidemiologia e controle das intoxicações por plantas no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 6, 2013. p. 752-758.

PORTER, M.B.; MACKAY, R.J.; UHL, E.; PLATT, S.R.; LAHUNTA, A. Doença neurológica supostamente associada à ingestão de *Solanum viarum* em cabras. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 223, n. 4, 2003 p. 501-504.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R.M.T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 1, 2001. p. 38-42.

RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ, M.C. Intoxicações por plantas e micotoxicoses *In*: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R. A. A.; BORGES, J.R.J. **Doenças de ruminantes e equídeos**. 3 ed. Santa Maria: Palloti, 2007. p. 99-221.

SILVA, K.N.; AGRA, M.F. Estudo farmacobotânico comparativo entre *Nicandra physalodes* e *Physalis angulata* (Solanaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 344-351, 2005.

SILVA, G. M. da; MAIXNER, A. R. Manejo de pastagens para gado leiteiro. do Curso de Produção de Leite Orgânico. EMBRAPA, 2016. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1034041/1/SilvaMaixner.pdf>>. Acesso em: 08 de abr. 2020

TEIXEIRA, J.C.; ANDRADE, G.A. Carboidrato na alimentação de Ruminantes. *In*: II Simposio de Forragicultura e pastagens, 2001, Lavras. **Temas em Evidencia. Lavras: Editora UFLA**. v.1. 2001. p.165-210.

TOKARNIA, C.H.; ARMIÉN, A.G.; BARROS, S.S.; PEIXOTO, P.V.; DÖBEREINER, J. Estudos complementares sobre a toxidez de *Lantana camara* (Verbenaceae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, n. 3/4, 1999. p. 128-132.

## DADOS ALIMENTARES E REPRODUTIVOS DE *Knodus moenkhausii*, (EIGENMANN E KENNEDY, 1903), DA SUB-BACIA DO RIO QUEIMA-PÉ EM TANGARÁ DA SERRA-MT

Data de aceite: 01/07/2020

### **Divina Sueide de Godoi**

Docente do Departamento de Ciências Biológicas,  
UNEMAT, Tangará da Serra-MT, Brasil

### **Joelson Viana Nogueira**

Discente do Curso de Ciências Biológicas,  
Universidade do Estado de Mato Grosso  
- UNEMAT, Tangará da Serra-MT, Brasil.  
\*joelsonviana5@hotmail.com

### **Luiz Antonio Jacyntho**

Docente do Departamento de Matemática,  
UNEMAT, Barra do Bugres-MT, Brasil

### **Cristiane Regina do Amaral Duarte**

Docente do Departamento de Ciências Biológicas,  
UNEMAT, Tangará da Serra-MT, Brasil

### **Jhonathan Ferreira Santos Maceno**

Biólogo graduado no curso de licenciatura e  
bacharelado em Ciências Biológicas, UNEMAT,  
Tangará da Serra-MT, Brasil

**RESUMO:** O objetivo do presente estudo foi analisar os aspectos alimentares e reprodutivos da espécie *Knodus moenkhausii* da sub-bacia do rio Queima-Pé, Tangará da Serra-MT. As coletas foram realizadas nos meses de julho e outubro do ano de 2016 e em janeiro, maio, julho e outubro de 2017. Os exemplares foram medidos (comprimento padrão e altura),

dissecados para coleta do conteúdo estomacal e sexados, classificando os estádios de maturação gonadal em: estágio A, B, C, D e E. Para determinar a proporção do volume do estômago ocupado pelo alimento, foi aplicado o método de classificação do grau de repleção. Nas análises do conteúdo estomacal foi utilizada a metodologia de compressão dos itens alimentares, para determinar a frequência volumétrica e a frequência de ocorrência de cada item encontrado para determinar o índice de importância alimentar (IAi%). Dentre os 180 espécimes de *K. moenkhausii* que foram analisados, 95 eram fêmeas e 85 machos. A espécie apresentou  $3,79 \pm 0,46$  (média  $\pm$  desvio padrão) cm de comprimento, altura de  $1,21 \pm 0,21$  cm e trato digestório com  $3,68 \pm 0,57$  cm de comprimento. Analisando os dados do período de seca, o estágio de maturação inicial (A), foi o mais encontrado nos meses de maio e julho do ano de 2017. Nos meses de chuva, o estágio maduro (D) foi predominante. Tanto no período da seca quanto no das cheias o grau de repleção mais encontrado foi o normal. Constata-se que a espécie *Knodus moenkhausii* possui uma dieta alimentar baseada em insetos e apresenta uma desova parcelada.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biodiversidade. Ecologia. Dieta alimentar.

FOOD AND REPRODUCTIVE ASPECTS OF *Knodus moenkhausii*, (EIGENMANN AND KENNEDY, 1903), OF THE SUBWAY BOWL OF THE QUEIMA-FOOT RIVER IN TANGARÁ DA SERRA-MT

**ABSTRACT:** The objective of the present study was to analyze the feeding and reproductive aspects of the species *Knodus moenkhausii* from the Queima-Pé river sub-basin, Tangará da Serra-MT. The samples were collected in the months of July and October of the year 2016 and in January, May, July and October of 2017. The samples were measured (standard length and height), dissected to collect the stomach contents and sexed, classifying the stages of gonadal maturation in stage A, B, C, D and E. To determine the proportion of the stomach volume occupied by the food, the classification method of the degree of replenishment was applied. In the analysis of the stomach contents, the food items compression methodology was used to determine the volumetric frequency and frequency of occurrence of each item found to determine the food importance index (IAi%). Among the 180 specimens of *K. moenkhausii* that were analyzed, 95 were females and 85 males. The species presented  $3.79 \pm 0.46$  (mean  $\pm$  standard deviation) cm in length, height of  $1.21 \pm 0.21$  cm and digestive tract with  $3.68 \pm 0.57$  cm in length. Analyzing the dry season data, the initial maturation stage (A) was the most found in the months of May and July of the year 2017. In the rainy months, the mature (D) stage was predominant. In both the dry and flood periods, the most commonly found degree of replenishment was normal. It is observed that the species *Knodus moenkhausii* has an insect-based diet and presents spawned spawning.

**KEYWORDS:** Biodiversity. Ecology. Food diet.

## 1 | INTRODUÇÃO

O rio Queima-Pé possui nascente ao sul, margeando o município de Tangará da Serra. Dispõe como afluentes, os córregos Figueira e Cristalino, em sua margem direita, na esquerda, três afluentes, os córregos da Pedreira, Tapera e Uberabinha (GROSSI, 2006).

Ainda existem poucos estudos relacionados as espécies de peixes encontradas em pequenos rios como o Queima-Pé, novas pesquisas são importantes para a compreensão dos nichos ecológicos e para a conservação das espécies presentes no rio (MACENO et al., 2016). Um fator que acaba dificultando a conservação e a preservação das várias espécies é a perda de mata ciliar dos rios e seus afluentes (CASATTI et al., 2012).

Alguns estudos referentes a sub-bacia do rio Queima-Pé, mostraram que as matas ciliares vêm sofrendo com o desmatamento e manejo desadequado das pastagens próximas aos corpos d'água o que podem causar maior turbidez da água e o assoreamento do rio, devido ao constante pisoteio do gado utilizado na pecuária extensiva (SOUZA; NUNES, 2008; RODRIGUES et al., 2014).

Os estudos de levantamento de ictiofauna permitem verificar a composição e a diversidade do local, favorecendo assim sua conservação, possibilitando a sua utilização para uma comparação futura (BOTINI et al., 2014).

A conservação dos teleósteos depende da manutenção das condições tanto aquáticas quanto terrestres, para que haja disponibilidade dos recursos alimentares (OLIVEIRA; BENNEMANN, 2005). Os peixes teleósteos possuem uma grande diversidade de hábitos alimentares que acabam sendo influenciados pelas características do alimento que ingerem (ABELHA et al., 2001).

Dentre os peixes teleósteos, a família Characidae possui grande presença na região neotropical (BUCKUP et al., 2007). Nessa região, alguns estudos abordaram aspectos da estrutura das comunidades de peixes em planícies de inundação. Alguns deles foram realizados no rio Paraná (AGOSTINHO; ZALEWSKI, 1995), no São Francisco (POMPEU; GODINHO, 2006), em rios da bacia amazônica (GOULDING et al., 1988; CHELLAPPA; SÁ-OLIVEIRA, 2005) e na planície de inundação do rio Cuiabá (BAGINSKI et al., 2007).

A espécie *Knodus moenkhausii* pertencente à família Characidae é de pequeno porte, com comprimento total registrado em algumas literaturas de 4,5 cm. Apresenta uma linha lateral completa, nadadeira dorsal com 9 raios, nadadeira anal com escamas na base e moderadamente longa. Possui uma alimentação variada ingerindo algas, formas imaturas de insetos e aracnídeos (CENEVIVA-BASTOS; CASATTI, 2007).

Para determinar a alimentação dos peixes é necessário realizar a análise do conteúdo estomacal, o processo pode ser aplicado com diferentes espécies, como realizado por DE AZEVEDO et al., (2016) com *Characidium gomesi* no córrego Russo e SANTOS et al., (2017) com *Rhamdia quelen* no rio Queima-Pé, ambos no município de Tangará da Serra.

Muitas espécies acabam adaptando-se as condições ambientais, principalmente em relação à estação de seca e cheia, e obtêm vantagens do ambiente em épocas favoráveis, como em períodos com uma maior disponibilidade de alimentos, que acabam na maioria das vezes influenciando no processo reprodutivo, já que os filhotes podem alimentar-se melhor para resistirem aos períodos de seca (LOWE-MCCONNELL, 1999).

Mesmo havendo variação nos períodos de seca e chuva algumas espécies não alteram seu padrão de preferência alimentar, sendo assim não afetadas pela mudança de período (DE SOUZA et al., 2016).

O presente trabalho objetivou analisar os aspectos alimentares e reprodutivos da espécie *Knodus moenkhausii* da sub-bacia do rio Queima-Pé, Tangará da Serra-MT, nos períodos de seca e cheia.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Área de Estudo

A sub-bacia do rio Queima-Pé possui uma área de 15.684 hectares e está situada na bacia hidrográfica do rio Sepotuba – MT (Figura 1). O rio localiza-se entre as coordenadas 14°33' e 14°43' de latitude Sul e 57°37' e 57°28' de longitude Oeste (GOUVEIA et al., 2015).

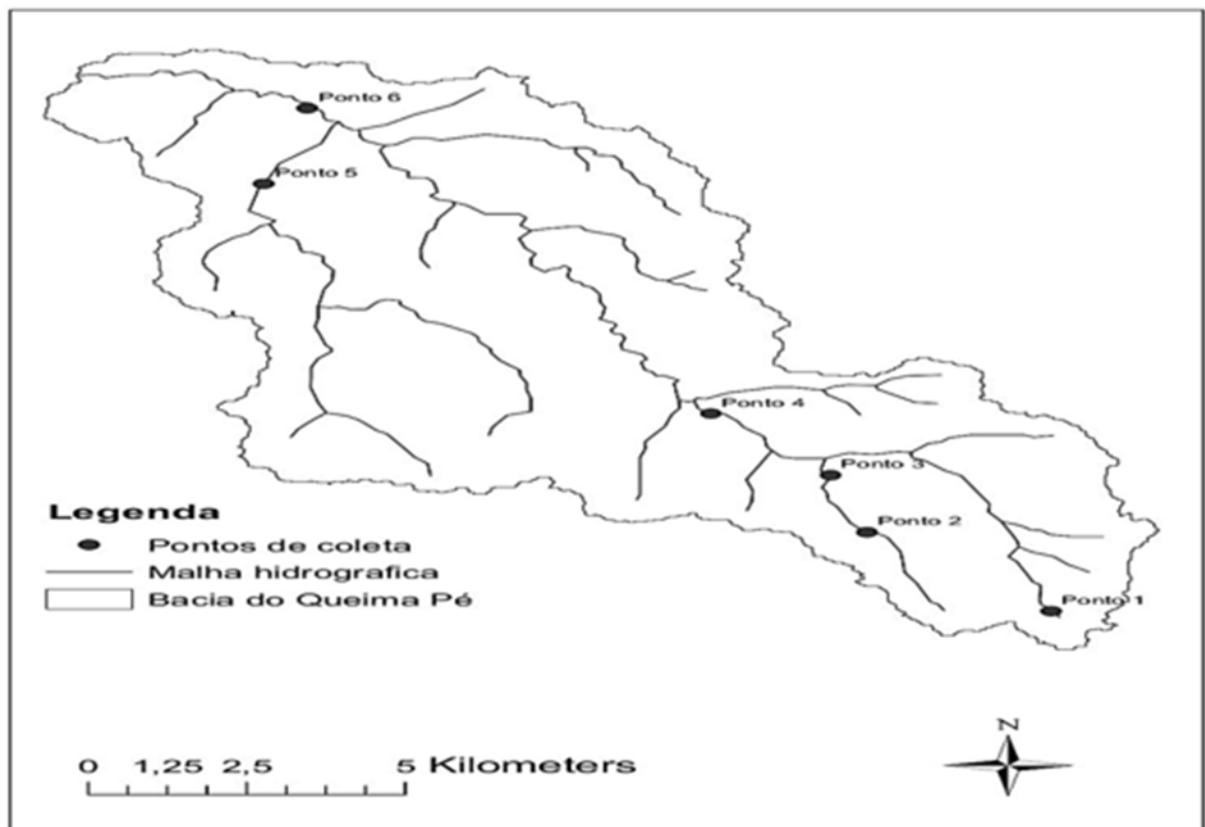


Figura 1. Esses foram os pontos de coleta no outro mapa tem a bacia. Localização da sub-bacia do rio Queima-Pé, Tangará da Serra-MT.

### 2.2 Metodologia

Para a realização deste trabalho de pesquisa, foram realizadas seis coletas no rio Queima-Pé ao decorrer do ano de 2016 e 2017, considerando o ciclo hidrológico local, sendo três no período de seca (julho de 2016 e em maio e julho de 2017) e três no período de chuva (outubro de 2016 e em janeiro e outubro de 2017).

A captura dos indivíduos foi realizada em seis pontos distintos do rio (nascente, ao longo do rio e afluentes) com autorização do SISBio nº 26784-1. Para a captura dos indivíduos, foram utilizados os seguintes materiais: tarrafas (malha de 12 mm, com 1,40 m de altura e 5 m), peneiras com malhas de 0,5 mm e redes de arrasto, com o tempo de coleta, de uma hora em cada um dos sítios amostrais.

Ao término da captura os indivíduos foram colocados em sacos plásticos com solução de eugenol 50 mg/L (PEREIRA-DA-SILVA et. al., 2009), e transferidos para formol 10% para fixação. Após 72 horas, os indivíduos foram conservados em álcool 70%.

Os exemplares coletados foram identificados com o auxílio de lupas com base no manual de identificação de peixes do pantanal (BRITSKI et al., 2007). Após a identificação e separação, os exemplares de *K. moenkhausii*, foram medidos (comprimento padrão e altura), dissecados para coleta do conteúdo estomacal e sexados com a utilização de lupa, classificando os estádios de maturação gonadal em: estágio A (imaturo), estágio B (em maturação inicial), estágio C (em maturação avançada), estágio D (maduro) e estágio E (repouso) (FÉLIX et al. 2009).

Na determinação dos períodos climáticos, utilizou-se como base o estudo de COLETTI, et. al., (2011), que definem os meses da estação da seca (maio a setembro) e chuva (outubro a abril).

Para analisar a proporção do volume do estômago ocupado pelo alimento, foi aplicado o método de classificação do grau de repleção, feito visualmente seguindo a escala: 0, vazio; 1,  $> 0$  e  $\leq 25\%$  (quase vazio); 2,  $> 25\%$  e  $\leq 50\%$  (meio cheio); 3,  $> 50\%$  e  $\leq 75\%$  (quase cheio) e 4,  $> 75\%$  (cheio), conforme metodologia proposta por BRAGA (2001).

A metodologia empregada para a análise do conteúdo estomacal foi a de compressão dos itens alimentares com lâmina de vidro sobre placa milimetrada até uma altura de 1mm, para determinar o volume e a ocorrência de cada item encontrado (HELLAWEL; ABEL, 1971).

Os dados obtidos foram submetidos aos seguintes índices: frequência de ocorrência (FO%) e frequência volumétrica (FV%). Para a determinação do índice de importância alimentar (IAi) dos diferentes itens foi utilizado o método descrito por Kawakami e Vazzoler (1980).

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

Dentre os 180 espécimes de *K. moenkhausii* analisados, foram capturadas 30 em cada mês, (julho e outubro) do ano de 2016 e (janeiro, maio, julho e outubro) de 2017, sendo que 95 eram fêmeas e 85 machos. A espécie apresentou  $3,79 \pm 0,46$  (média  $\pm$  desvio padrão) cm de comprimento, altura de  $1,21 \pm 0,21$  cm e trato digestório com  $3,68 \pm 0,57$  cm de comprimento.

Utilizando-se como base o estudo de COLETTI, et. al. (2011), que definem os meses da estação da seca (maio a setembro) e chuva (outubro a abril), os dados das coletas foram analisados de acordo com as estações.

Analisando os dados do período de seca, o estágio de maturação inicial (B) foi o mais encontrado nos meses de maio e julho do ano de 2017 (Figura 2). Nos meses de chuva, o estágio maduro (D) foi predominante no mês de outubro de 2016 (Figura 2).

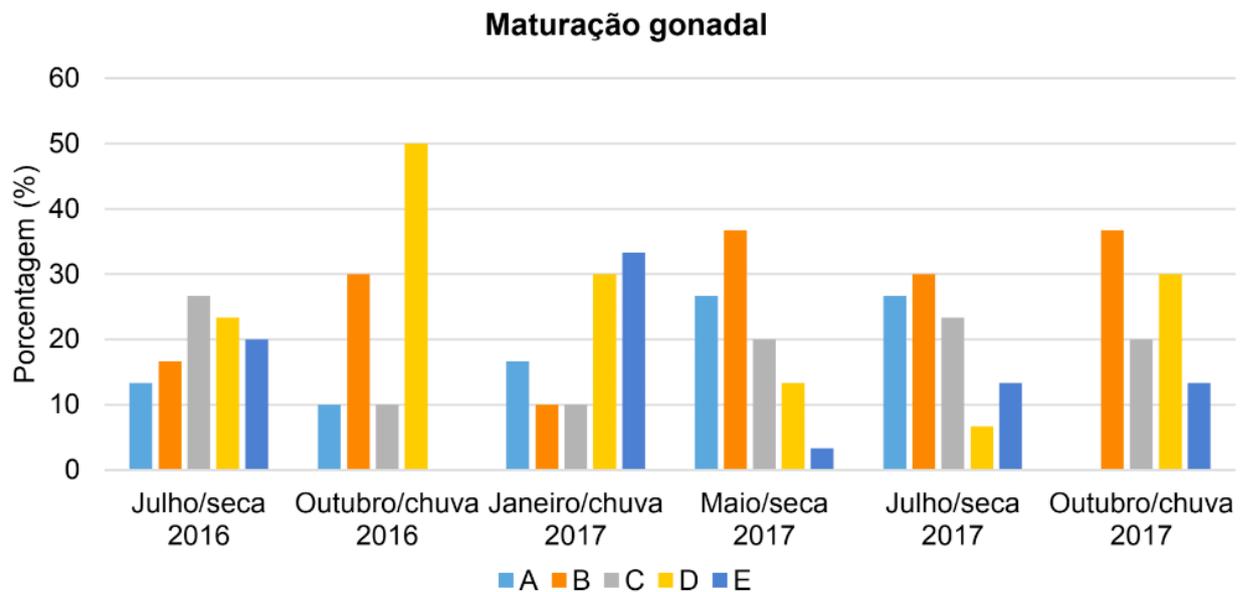


Figura 2. Porcentagem do estágio de maturação gonadal de *K. moenkhausii* coletados na sub-bacia do Rio Queima-Pé, entre 2016 e 2017 de acordo com os meses de coleta. A imaturo, B em maturação inicial, C em maturação avançada, D maduro, E repouso.

Comparando-se os dois períodos, a espécie *K. moenkhausii* apresenta uma desova parcelada, pois a maioria dos estádios de maturação gonadal foram encontrados em todos os meses. Possuir uma desova parcelada é uma vantagem que garante a sobrevivência da espécie, já que os indivíduos estarão em atividade reprodutiva o ano inteiro. Resultados similares foram encontrados por Ceneviva-Bastos (2007), que analisou a biologia de *K. moenkhausii* em riachos do Alto Paraná.

Tanto no período da seca quanto no das cheias o grau de repleção mais encontrado foi o normal (Grau 2), entretanto os horários de atividade alimentar de algumas espécies podem influenciar em seu grau de repleção estomacal, como foi constado por Canan e Gurgel (2002), que analisaram a dieta alimentar de *Metynnis roosevelti* na lagoa do Jiqui Parnamirim.

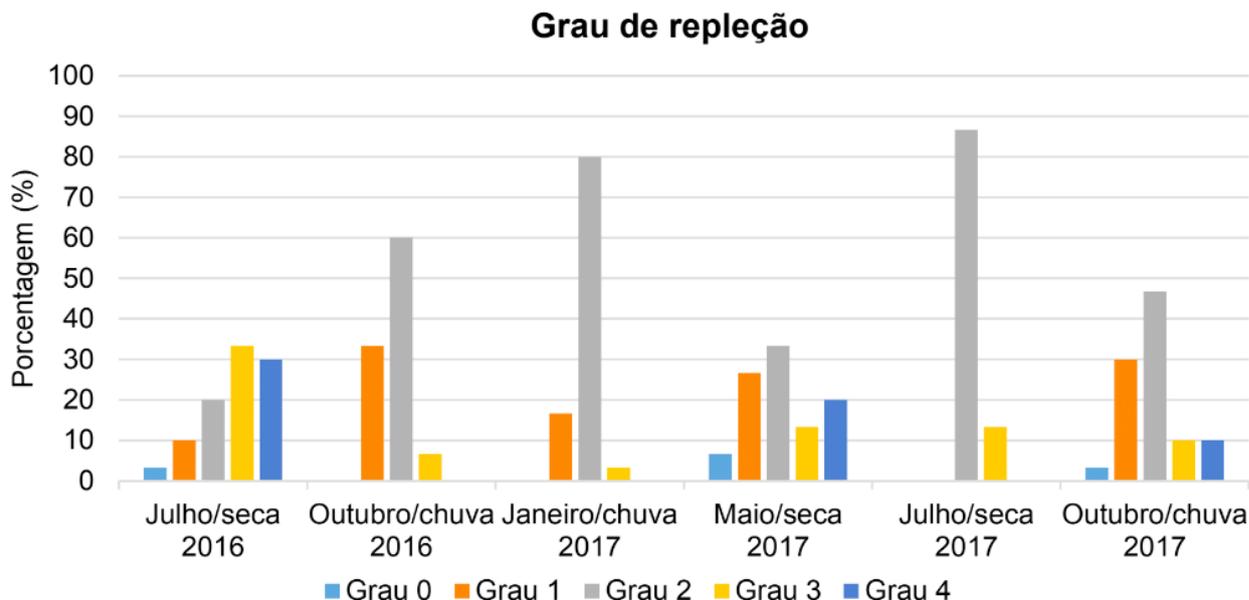


Figura 3. Porcentagem do grau de repleção dos estômagos de *K. moenkhausii* coletados na sub-bacia do Rio Queima-Pé, entre 2016 e 2017 de acordo com os meses de coleta. Grau 0 igual a vazio, Grau 1 pouco, Grau 2 normal, Grau 3 cheio, Grau 4 muito cheio.

Nas Tabelas 1, 2 e 3 estão representados os itens alimentares identificados no período da seca. Em julho (Tabela 1), foi possível determinar 7 categorias de itens alimentares, sendo que o item alimentar que mais se destacou foi o de resto de insetos com uma importância alimentar de 76,46%.

No mês de maio (Tabela 2), foram identificadas 9 categorias de itens alimentares, sendo itens pertencentes a Classe Insecta (restos e larvas) com maior importância alimentar. Em julho (Tabela 3), foram determinadas 11 categorias de itens alimentares, sendo a de resto de insetos 59,61% com maior importância.

ITENS	mm <sup>3</sup>	Ni	FO (%)	FV (%)	IAi (%)
Coleoptera	25	2	6,67	3,21	0,42
Detrito	128	12	40	16,43	12,89
Larvas de insetos	41	3	10	5,26	1,03
Resto de insetos	414	22	73,33	53,15	76,46
Resto de vegetais	138	7	23,33	17,72	8,11
Sedimento	21	5	16,67	2,7	0,88
Sementes	12	2	6,67	1,54	0,2

Tabela 1. Itens alimentares identificados no conteúdo estomacal de *K. moenkhausii* coletados em julho de 2016, no rio Queima-Pé. Dados representados por milímetro cúbico do item alimentar (mm<sup>3</sup>); número de estômagos que continha o item alimentar (Ni); frequência de ocorrência (FO%); frequência volumétrica (FV%) e índice de importância alimentar (IAi).

ITENS	mm <sup>3</sup>	Ni	FO (%)	FV (%)	IAi (%)
Chlorophyceae	32	6	20	5,02	2,19
Coleoptera	8	1	3,33	1,26	0,09
Detrito	28	5	16,67	4,40	1,59
Hymenoptera	6	1	3,33	0,94	0,07
Larvas de insetos	191	14	46,67	29,98	30,46
Resto de insetos	297	18	60	46,62	60,9
Resto de vegetais	42	6	20	6,59	2,87
Sedimento	32	5	16,67	5,02	1,82
Sementes	1	1	3,33	0,16	0,01

Tabela 2. Itens alimentares identificados no conteúdo estomacal de *K. moenkhausii* coletados em maio de 2017, no rio Queima-Pé. Dados representados por milímetro cúbico do item alimentar (mm<sup>3</sup>); número de estômagos que continha o item alimentar (Ni); frequência de ocorrência (FO%); frequência volumétrica (FV%) e índice de importância alimentar (IAi).

ITENS	mm <sup>3</sup>	Ni	FO (%)	FV (%)	IAi (%)
Coleoptera	9	1	3,33	1,03	0,06
Detrito	111	15	50	12,69	11,89
Escamas	8	2	6,67	0,91	0,11
Hymenoptera	77	10	33,33	8,8	5,5
Larvas de insetos	68	9	30	7,77	4,37
Orthoptera	8	1	3,33	0,91	0,06
Ovos de insetos	8	1	3,33	0,91	0,06
Resto de insetos	363	23	76,67	41,49	59,61
Resto de vegetais	102	14	46,67	11,66	10,2
Sedimento	82	12	40	9,37	7,03
Sementes	39	4	13,33	4,46	1,11

Tabela 3. Itens alimentares identificados no conteúdo estomacal de *K. moenkhausii* coletados em julho de 2017, no rio Queima-Pé. Dados representados por milímetro cúbico do item alimentar (mm<sup>3</sup>); número de estômagos que continha o item alimentar (Ni); frequência de ocorrência (FO%); frequência volumétrica (FV%) e índice de importância alimentar (IAi).

Os dados dos itens alimentares identificados na estação das chuvas estão presentes nas Tabelas 4, 5 e 6. No mês de outubro, dos exemplares analisados, foram identificadas 11 categorias de itens alimentares. O item que teve um maior índice de importância alimentar foi o de Hymenoptera 46,5 seguido pelo de resto de insetos 32,83% (Tabela 4).

Em janeiro, foram identificadas 11 categorias de itens alimentares, sendo 6 itens pertencentes à classe *Insecta*. O item que teve um maior índice de importância alimentar foi o de resto de insetos 69,55% (Tabela 5), seguido de larvas de insetos 21,53%. Entre as 9 categorias alimentares registradas em outubro, a mais expressiva foi a de resto de insetos com 58,94% de importância alimentar (Tabela 6).

ITENS	mm <sup>3</sup>	Ni	FO (%)	FV (%)	IAi
Chlorophyceae	55	6	20	4,07	1,62
Coleoptera	35	4	13,33	2,59	0,69
Detrito	232	15	50	17,19	17,05
Escamas	3	1	3,33	0,22	0,01
Hymenoptera	593	16	53,33	43,93	46,5
Larvas de insetos	40	3	10	2,96	0,59
Ovos de peixe	4	1	3,33	0,3	0,02
Resto de insetos	335	20	66,67	24,81	32,83
Resto de vegetais	18	2	6,67	1,33	0,18
Sedimento	10	3	10	0,74	0,15
Sementes	25	3	10	1,85	0,37

Tabela 4. Itens alimentares identificados no conteúdo estomacal de *K. moenkhausii* coletados em outubro de 2016, no rio Queima-Pé. Dados representados por milímetro cúbico do item alimentar (mm<sup>3</sup>); número de estômagos que continha o item alimentar (Ni); frequência de ocorrência (FO%); frequência volumétrica (FV%) e índice de importância alimentar (IAi).

ITENS	mm <sup>3</sup>	Ni	FO (%)	FV (%)	IAi (%)
Coleoptera	24	5	16,67	2,74	0,66
Detrito	81	16	53,33	9,25	7,18
Escamas	6	1	3,33	0,68	0,03
Hymenoptera	27	4	13,33	3,08	0,6
Larvas de insetos	216	18	60	24,66	21,53
Lepdoptera	6	1	3,33	0,68	0,03
Ovos de insetos	3	1	3,33	0,34	0,02
Resto de insetos	483	26	86,67	55,14	69,55
Resto de vegetais	11	3	10	1,26	0,18
Sedimento	17	2	6,67	1,94	0,19
Sementes	2	2	6,67	0,23	0,02

Tabela 5. Itens alimentares identificados no conteúdo estomacal de *K. moenkhausii* coletados em janeiro de 2017, no rio Queima-Pé. Dados representados por milímetro cúbico do item alimentar (mm<sup>3</sup>); número de estômagos que continha o item alimentar (Ni); frequência de ocorrência (FO%); frequência volumétrica (FV%) e índice de importância alimentar (IAi).

ITENS	mm <sup>3</sup>	Ni	FO (%)	FV (%)	IAi
Chlorophyceae	13	3	10	2,36	0,55
Coleoptera	68	4	13,33	12,32	3,84
Detrito	93	13	43,33	16,85	17,05
Hymenoptera	53	3	10	9,6	2,24
Larvas de insetos	6	1	3,33	1,09	0,08
Resto de insetos	199	21	70	36,05	58,94
Resto de vegetais	56	11	36,67	10,14	8,69
Sedimento	59	10	33,33	10,69	8,32
Sementes	5	4	13,33	0,91	0,28

Tabela 6. Itens alimentares identificados no conteúdo estomacal de *K. moenkhausii* coletados em outubro de 2017, no rio Queima-Pé. Dados representados por milímetro cúbico do item alimentar (mm<sup>3</sup>); número de estômagos que continha o item alimentar (Ni); frequência de ocorrência (FO%); frequência volumétrica (FV%) e índice de importância alimentar (IAi).

A maioria dos itens alimentares em ambos os períodos são alóctones (sementes e insetos terrestres), sendo a classe Insecta terrestre predominante com o maior índice de importância para a espécie. Alguns insetos não apresentam mecanismos de defesa eficientes, sendo facilmente capturados por peixes (BRANDÃO-GONÇALVES et al., 2010).

No período de seca houve um maior consumo de restos vegetais em relação ao período de chuvas. A disponibilidade de alimentos na seca foi menor, sendo insetos e material vegetal os mais consumidos, o mesmo também foi verificado por Yamamoto et al., (2004).

Peixes menores, como a espécie estudada, estão adaptados a consumirem alimentos variados tanto insetos aquáticos quanto terrestres. Existe uma relação entre a alimentação e a região de vegetação próxima às margens, a importância está ligada ao fato de que essas áreas garantem uma fonte de alimentação alóctone para várias espécies de peixes (CASTRO, 1999).

#### 4 | CONCLUSÃO

Com base nos dados obtidos no decorrer de dois anos, pode-se constatar que a espécie *K. moenkhausii* apresenta uma desova parcelada, com predominância de desova próximo aos meses de janeiro e outubro.

Conclui-se que a espécie possui um hábito alimentar insetívoro.

#### REFERÊNCIAS

ABELHA, M. C. F.; AGOSTINHO, A. A.; GOULART, E. Plasticidade trófica em peixes de água doce. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 2, p. 425–434, 2001.

AGOSTINHO, A.A.; E ZALEWSKI, M. The dependence of fish community structure and dynamics on floodplain and riparian ecotone zone in Parana River, Brazil. **Hidrobiologia**, 303: 141-148. 1995.

BAGINSKI, L. J., FLORENTINO, A. C., MÉDICE FERNANDES, I., MAGNO FERREIRA PENHA, J., MATEUS, L. A. D. F. ( A dimensão espacial e temporal da diversidade de peixes da zona litoral vegetada de lagoas marginais da planície de inundação do rio Cuiabá, Pantanal, Brasil. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 7, n. 3, p. 233-238, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-06032007000300025> Doi: 10.1590/S1676-06032007000300025

BOTINI N., BOTINI, A. F., DE AZEVEDO, T. A., DE SOUZA, T. H., GODOI, D. S. Levantamento preliminar da ictiofauna do Corrego Russo em Tangara da Serra – Mato Grosso. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.19; p. 2339-2341. 2014.

BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Rio de Janeiro: **Museu Nacional**, p.196. 2007.

BRAGA, F. M. S. I. Crescimento e mortalidade de *Leporinus friderici* (Ostariophysi, Anostomidae) na represa de Volta Grande, rio Grande, localizada entre os Estados de Minas Gerais e São Paulo, Brasil. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 2, p.415- 420, 2001.

BRANDÃO-GONÇALVES, L.; OLIVEIRA, S. A.; LIMA-JUNIOR, S. E. Hábitos alimentares da ictiofauna do córrego Franco, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Biota Neotropica**, Campinas, v.10, n. 2, p. 21-30, abr./jun. 2010. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1590/S1676-06032010000200001>> doi: 10.1590/S1676-06032010000200001

BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. Peixes do Pantanal: manual de identificação. 2. ed. Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**, 2007.

CANAM, B.; GURGEL, Hélio de Castro Bezerra. Ritmicidade da alimentação e dieta de *Metynnis roosevelti* Eigenmann (Characidae, Myleinae) da Lagoa do Jiqui, Parnamirim, Rio Grande do Norte, Brasil. **Revta bras. Zool**, v. 19, n. 2, p. 309-630, 2002.

CASATTI, L.; TERESA, F. B.; GONÇALVES, S. T; BESSA, E; MANZOTTI A. R; GONÇALVES, C. S; ZENI, J. O. From forests to cattail: how does the riparian zone influence stream fish? **Neotropical Ichthyology**, v. 10, n. 1, p. 205-214, 2012.

CASTRO, R.M.C. Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos causais. In *Ecologia de Peixes de Riachos* (E.P. Caramaschi, R. Mazzoni & P.R. Peres-Neto, eds.). **Série Oecologia Brasiliensis**, v.VI. PPGE-UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil, p.139-155. 1999.

CHELLAPA, S.; SÁ-OLIVEIRA, J.C.; N.T. CHELLAPA. Fish fauna of a temporary lake in an Amazonian Conservation Area. **Acta limnology**. Bras. 17(3):283- 289. 2005.

CENEVIVA-BASTOS, M.; CASATTI, L. Oportunismo alimentar de *Knodus moenkhausii* (Teleostei, Characidae): uma espécie abundante em riachos do noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 97, n. 3, p. 7–15, 2007.

COLETTI, A. J., DE FREITAS, P. S. L., INOUE, M. H., MARTINS, J. A.; DALLACORT, R. Distribuição das chuvas no município de Tangará da Serra, médio norte do Estado de Mato Grosso, Brasil & Rain distribution in Tangará da Serra, mid-northern Mato Grosso State, Brazil. **Acta Scientiarum: Agronomy**, v. 33, n. 2, p. 193-200, 2011.

DE AZEVEDO, T. A., DE SOUZA, T. H., BOTINI, A. F., DE GODOI, D. S., JACYNTHO, L. A. Dieta natural de *Characidium gomesi* Travassos, 1956 do córrego Russo, no município de Tangará da Serra–MT. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.13 n.24; p. 1202-1137, 2016. DOI: 10.18677/EnciBio\_2016B\_112

DE SOUZA, T. H.; DE GODOI, D. S.; DE AZEVEDO, T. A.; BOTINI, A. F.; JACYNTHO, L. A. Aspecto alimentar e reprodutivo do *Corydoras aeneus* (Gill, 1858), do córrego Russo, Tangará da Serra – MT. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.13 n.24; p. 1124-1137, 2016. DOI: 10.18677/EnciBio\_2016B\_106

FÉLIX, R.T.S., SEVERI, W., SANTOS, A.J.G., EL-DEIR, A. A. A., SOARES, M.G. & EVÊNCIO NETO, J. Desenvolvimento ovariano de *Plagioscion squamosissimus* (Heckel,1840) (Actinopterygii, Perciformes), no reservatório de Pedra, Rio de Contas, Bahia. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 9, n. 3, p.131-136, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1676-06032009000300012>> doi: 10.1590/S1676-06032009000300012

GOULDING, M.; CARVALHO, M.L.; FERREIRA, E.G. Rio Negro: rich life in poor water. **The Hague**: SBC Academic Publishing, 200p. 1988.

GOUVEIA, R. G. L.; GALVANIN, E. A. S.; NEVES, M. A. S.; NEVES, R.J. Análise da fragilidade ambiental na bacia do rio Queima-Pé, Tangará da Serra, MT. **Pesquisas em Geociências**. Porto Alegre, v. 42 p. 131-140, 2015. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/igeo/pesquisas/4202/024202.pdf>> doi: 4202/024202.

GROSSI, C.H. Diagnostico e Monitoramento da Microbacia Hidrográfica do Rio Queima Pé, MT. **Tese de Doutorado**. Universidade Paulista, Faculdade de Ciência Agrônômicas, Botucatu, SP, 2006.

HELLAWELL, J.; ABEL, R. A rapid volumetric method for the analysis of the food of fishes. **Journal of Fish Biology**, v.3, p. 29-37, 1971. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8649.1971.tb05903.x>> doi: 10.1111/j.1095-8649.1971.tb05903.x

KAWAKAMI, E.; VAZZOLER, G. Método gráfico e estimativa de índice alimentar aplicado no estudo de alimentação de peixes. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, São Paulo, v.29, n.2. p.205-207. 1980. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0373-55241980000200043>> doi: 10.1590/S0373-55241980000200043

LOWE-McCONNEL, R. H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo: editora da universidade de São Paulo, 1999.

MACENO, J. F. S.; GODOI, D. S.; NUNES, W. C.; DUARTE, C. R. A.; JACYNTHO, L. A. Ecologia de *Moenkhausia lopesi*, (Britski & Silimon, 2001), (Characiformes: Characidae), da Sub-bacia do rio Queima-Pé em Tangará da Serra-MT. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 13 n. 24, p. 1214-1225, 2016. Doi: 10.18677/EnciBio\_2016B\_113.

OLIVEIRA, D. C.; BENNEMANN, S. T. Ictiofauna, recursos alimentares e relações com as interferências antrópicas em um riacho urbano no sul do Brasil. **Biota Neotropica**, v.5, n.1, p.95-107, 2005.

PEREIRA-DA-SILVA, E. M.; OLIVEIRA, R. H. F.; RIBEIRO, M. A. R.; COPPOLA, M. P. Efeito anestésico do óleo de cravo em alevinos de lambari. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.6, p.1851-1856, set. 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782009005000127>> Doi: 10.1590/S0103-84782009005000127

RODRIGUES, L. C.; NEVES, S. M. A.; NEVES, R. J.; GALVIN, E. A. S.; SILVA, J. S. V. Avaliação do grau de transformação antrópica da paisagem da bacia do Rio Queima-Pé Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**, n.32, p.52-64, 2014.

SANTOS, J. D. S.; DE GODOI, D. S.; MACENO, J. F. S.; JACYNTHO, L. AN.; DUARTE, C. R. D. A. Biologia da espécie *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824), (Siluriformes: Pimelodidae). Na microbacia do rio Queima-Pé no município de Tangará Da Serra-MT, Brasil. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.14 n.26; p. 816-826, 2017. DOI: 10.18677/EnciBio\_2017B71

SOUZA, H.M.; NUNES, J.R.S. Avaliação dos parâmetros físico-químicos e bacteriológicos do córrego Figueira pertencente à microbacia do Queima Pé de Tangará da Serra-MT. **Revista Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v.5, n.2, p.110-124, 2008.

YAMAMOTO, K. C.; SOARES, M. G. M.; FREITAS, C. E. C. Alimentação de *Triportheus angulatus* (Spix & Agassiz, 1829) no lago Camaleão, Manaus, AM, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 4, p. 653-659, 2004.

## ETNOCONHECIMENTO SOBRE POLINIZAÇÃO EM UMA COMUNIDADE RURAL DA REGIÃO SEMIÁRIDA

*Data de aceite: 01/07/2020*

*Data de submissão: 29/04/2020*

### **Bruna Letícia Pereira Braga**

Universidade Federal Rural de Pernambuco-  
UFRPE

Recife - Pernambuco

Currículo lattes: <http://lattes.cnpq.br/1668352593289511>

### **José Vinícius Oliveira Silva**

Faculdade de Educação, Ciências e Letras de  
Iguatu – FECLI/UECE

Iguatu - Ceará

Currículo lattes: <http://lattes.cnpq.br/4880726590477539>

### **Gabrielle Kathelin Martins da Silva**

Faculdade de Educação, Ciências e Letras de  
Iguatu - FECLI

Iguatu - Ceará

Currículo lattes: <http://lattes.cnpq.br/9344234816144229>

### **Fernanda Fernandes da Silva**

Universidade Federal Rural de Pernambuco-  
UFRPE

Recife - Pernambuco

Currículo lattes: <http://lattes.cnpq.br/3145354892668354>

### **Marlos Dellan de Souza Almeida**

Universidade Federal Rural de Pernambuco-  
UFRPE

Recife - Pernambuco

Currículo lattes: <http://lattes.cnpq.br/6584944075950770>

### **Célio Moura Neto**

Faculdade de Educação, Ciências e Letras de  
Iguatu – FECLI/UECE, Departamento do Curso de  
Ciências Biológicas

Iguatu - Ceará

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6536186677259292>

### **Jefferson Thiago Souza**

Faculdade de Educação, Ciências e Letras de  
Iguatu – FECLI/UECE, Departamento do Curso de  
Ciências Biológicas

Iguatu - Ceará

Currículo lattes: <http://lattes.cnpq.br/5589855068988374>

**RESUMO:** A exploração de recursos naturais e inserção de manejos para produção agrícola e pecuária é um dos principais problemas enfrentados na caatinga. Essa exploração e extrativismo de recursos naturais podem determinar a perda de diversos processos na natureza. A polinização é um serviço ecossistêmico fundamental para manutenção dos ecossistemas. A interação entre plantas e

polinizadores é muito importante para a reprodução das angiospermas. Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo investigar o conhecimento tradicional de uma comunidade rural sobre conhecimento de plantas e aspectos relacionados à polinização. As espécies modelos do estudo para percepção da polinização foram *Senna uniflora* e *Blainvillea acmella* que ocorrem na comunidade. Para a coleta de informações foram utilizadas entrevista semiestruturada (*snow ball*), lista livre, gravador de voz e estímulos visuais. Os dados etnoecológicos foram analisados qualitativamente apenas de forma descritiva. Os moradores da comunidade demonstraram uma compreensão relevante quanto ao processo de polinização, sua importância e recompensas florais como pólen e néctar, animais polinizadores como as abelhas, beija-flores e morcegos e ainda total conhecimento sobre a flora da região.

**PALAVRAS-CHAVE:** Conhecimento tradicional; Recursos florais; Caatinga.

## ETHNOCOGNITION ABOUT POLLINATION IN A RURAL COMMUNITY IN THE SEMIARID REGION

**ABSTRACT:** The exploitation of natural resources and the insertion of managements for agricultural and livestock production is one of the main problems faced in the caatinga. This exploration and extraction of natural resources can determine the loss of several processes in nature. Pollination is a fundamental ecosystem service for maintaining ecosystems. The interaction between plants and pollinators is very important for the reproduction of angiosperms. Given the above, this work aims to investigate the traditional knowledge of a rural community about plant knowledge and aspects related to pollination. The model species in the study for pollination perception were *Senna uniflora* and *Blainvillea acmella* that occur in the community. For the collection of information, semi-structured interviews (*snow ball*), free list, sound recorder and visual stimuli were used. The ethnoecological data were analyzed qualitatively only in a descriptive manner. The residents of the community demonstrated a relevant understanding of the pollination process, its importance and floral rewards such as pollen and nectar, pollinating animals such as bees, hummingbirds and bats and even full knowledge of the region's flora.

**KEYWORDS:** Traditional knowledge; Floral resources; Caatinga.

## 1 | INTRODUÇÃO

Os recursos naturais são finitos e estão sendo utilizados de maneira abusiva, com finalidades mercantis que se baseiam na sua extração e exploração. Registros históricos relatam que a humanidade se vale da extração desses recursos e essas práticas têm levantado inúmeras questões sobre responsabilidade e respeito ao meio ambiente (GARIGLIO *et al.* 2010). As alterações decorrentes de implementação de manejos modificam não só visualmente a paisagem, mas também as interações ecológicas. Essas

atividades são as de maior impacto sobre a Caatinga e uma interação ecológica que pode ser modificada é a polinização, processo que ocorre com a interação entre plantas e animais e assegura a reprodução das angiospermas que compõem a maior parte da cobertura vegetal terrestre (DRUMOND *et al.* 2000; IMPERATRIZ-FONSECA *et al.* 2012).

O serviço ecossistêmico gerado pela polinização é essencial à vida, pois propicia a reprodução cruzada entre plantas (IMPERATRIZ-FONSECA, 2004). As queimadas, retirada de vegetação nativa e uso de agroquímicos são os principais responsáveis pelo impacto sobre a paisagem, visto que alteram as interações entre as plantas e os polinizadores, gerando barreiras físicas que dificultam a chegada do polinizador até as flores (RICKETTS *et al.* 2008).

Aliado a essa utilização de recursos pela população rural e a importância do serviço de polinização, buscar conhecer a percepção da polinização por estas pessoas é essencial para relacionar o conhecimento acadêmico e tradicional a fim de se subsidiar estratégias de conservação dos recursos naturais (SANTORO *et al.* 2018). Na Caatinga existem populações rurais que sobrevivem da agricultura familiar, sendo os cultivos em pequena escala a principal fonte de renda destas pessoas, contudo, estes serviços agropastoris tendem a influenciar direta e indiretamente na polinização (LEAL *et al.* 2017). Os sistemas de manejos causam a alteração no habitat natural de espécies de plantas e de animais sendo totalmente influentes nos processos de regeneração ou sucessão ecológica, porém, quando utilizado de forma sustentável este impacto pode ser amenizado (MAIA *et al.* 2019).

Diante do exposto, o presente trabalho objetiva evidenciar o conhecimento tradicional de uma comunidade rural sobre polinização e sua importância na manutenção e conservação de ambientes nativos da Caatinga.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Área de estudo

O estudo foi realizado no Sítio Itans, comunidade rural localizada no município de Iguatu - CE (06°21'34"S e 39°17'55"W), distante a 8,5km da sede do município. Segundo a classificação de Koppen o clima da região é BSw'h', semiárido quente, com temperatura média mensal sempre superior a 18°C.

A comunidade rural situa-se às margens do rio Jaguaribe, e alguns moradores relataram problemas ambientais em decorrência da retirada de areia do leito, o que dificulta o abastecimento de água.

Os moradores se organizam através da associação comunitária, o que possibilita maior engajamento nas tomadas de decisões em prol das famílias residentes. A população da comunidade é composta basicamente de agricultores e autônomos, e tem como

atividade principal a agricultura com a plantação de arroz e a pecuária com a criação de gado.

Composta por aproximadamente 200 famílias, a comunidade não possui escola em sua sede, onde as crianças e jovens se deslocam até a sede do município para estudarem, de acordo com informações da agente de saúde local.



Figura 1: Comunidade rural de Itans

Foto: Jefferson Thiago Souza

## 2.2 Espécies estudadas

### 2.2.1 *Senna uniflora* (Mill.) H.S. Irwin & Barneby

O gênero *Senna* depende da polinização realizada por abelhas fêmeas, que coletam pólen para alimentar as larvas e a coleta do pólen acontece por vibração (GOTTSBERGER et al. 1988), processo denominado “buzz-pollination”. Essa vibração é responsável pela liberação do pólen que eventualmente é usado para alimentação enquanto outra parte alcança o estigma de outras flores durante visitas das abelhas (BUCHMANN, 1983). As flores de *S. uniflora* (Figura 2) são classificadas como zigomorfas com forma da pétala centro adaxial sub quadrangular elíptica e sete estames férteis. As espécies do gênero apresentam um polimorfismo denominado como enantioestilia, caracterizado por apresentar flores recíprocas (direita e esquerda) formando imagens especulares umas das outras (ALMEIDA et al. 2015).



Figura 2: Flor de *Senna uniflora*

Figura 3: Flor de *Blainvillea acmella*

Fotos: Mychelle Sousa Fernandes

### 2.2.2 *Blainvillea acmella* (L.) Philipson

O gênero *Blainvillea* pertence à família Asteraceae, e a espécie *B. acmella* (Figura 3) apresenta inflorescências com flores brancas hermafroditas dispostas no centro da inflorescência e flores femininas na periferia, capítulos longo-pedunculados, oblongos e brácteas verdes que durante a maturação tornam-se paleáceas (MOREIRA; BRAGANÇA. 2011).

A planta é popularmente conhecida como erva-palha ou picão grande, constitui um grupo de aproximadamente dez espécies (SPRING *et al.* 1999). Não existem muitos estudos desse gênero, somente cinco espécies têm sido estudadas quanto a composição química (GOMES *et al.* 2010).

## 2.3 Coleta e análise de dados

A amostra consistiu em 10 moradores da comunidade de Itans e para o levantamento de dados foi utilizada a técnica de coleta *snowball* ou “bola de neve”, onde cada entrevistado indica um novo, cujo ele considera especialista. Como instrumento guia da coleta, foi utilizado um questionário semiestruturado, que permitiu a realização da entrevista. Para facilitar também na análise de dados, foi solicitado o consentimento dos devidos entrevistados, para a gravação de áudio das entrevistas.

As entrevistas aconteceram através de visitas domiciliares a moradores da comunidade, aos quais foi apresentado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE de que trata a resolução 466/2012, que garante o sigilo à identidade dos entrevistados.

O questionário guia da coleta, auxilia como recurso para verificar os conhecimentos da comunidade sobre a flora local e aspectos gerais da polinização, buscando deixar o entrevistado à vontade nas suas respostas como forma de não comprometer a entrevista por nervosismo ou dúvidas (ALBUQUERQUE, 2006).

Previamente à execução da entrevista foi realizado um levantamento preliminar sobre os conhecimentos de visitantes florais e quais flores dentre as espécies vegetais eles

conhecem através de estímulos visuais, propiciando um espectro mais delineado sobre quais moradores podem ser considerados informantes chave. Durante as entrevistas foram feitas anotações que para fomentar a entrevista, e as atividades realizadas durante o trabalho de campo (ALBUQUERQUE; LUCENA; ALENCAR, 2010).

### 3 | RESULTADOS

As perguntas de caráter socioeconômico, tais como idade e sexo dos participantes, 60% dos entrevistados eram homens, destes com idade média de 51 a 60 anos (Figura 4).

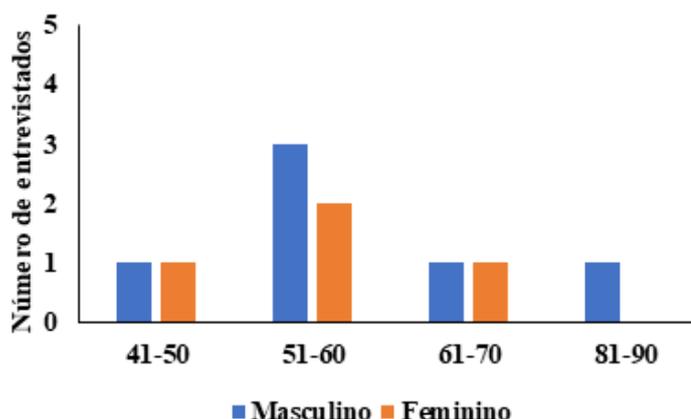


Figura 4 – Sexo e idade dos entrevistados na Comunidade de Itans em Iguatu/CE

Sobre a ocupação dos entrevistados, 60% trabalham com agricultura. Quando perguntados sobre o tempo em que moravam na comunidade, 80% responderam que sempre foram moradores do sítio Itans. Partindo para o conhecimento tradicional eles foram indagados acerca das plantas nativas que conheciam e sua forma de uso conforme apresentado na tabela a seguir:

Nome científico	Nome popular	Tipos de uso
<i>Mimosa hostilis</i> (C.Mart.) Benth.	Jurema	B
<i>Croton blanchetianus</i> Baill.	Marmeleiro	B
<i>Senna Obtusifolia</i>	Mata-pasto	A
<i>Combretum leprosum</i> Mart.	Mufumbo	B
<i>Ziziphus joazeiro</i> Mart.	Juazeiro	-
<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> Benth.	Sabiá	B
<i>Caesalpinia ferrea</i> Mart.	Jucá	A
<i>Spondias purpúrea</i> L.	Siriguela	-
<i>Prunus domestica</i>	Almeixeira	-

<i>Anacardium occidentale</i> L.	Cajueiro	A
<i>Myracrodruon urundeuva</i> (Engl.)	Aroeira	A
<i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.	Mutamba	-
<i>Hymenaea courbaril</i> L.	Jatobá	A
<i>Licania tomentosa</i> (Benth.) Fritsch.	Oitizeiro	-
<i>Dipteryx odorata</i>	Cumarú	-
<i>Tabebuia</i> sp.	Pau-d'arco	B
<i>Pityrocarpa moniliformis</i> (Benth.)	Catanduva	B
<i>Spondias dulcis</i> Parkinson	Cajarana	C
<i>Croton rhamnifolius</i> Muell. Arg.	Velame	-
<i>Bauhinia cheilantha</i> (Bong.) Steud	Mororó	-
<i>Cereus jamacaru</i> DC.	Mandacaru	-
<i>Uncaria tomentosa</i> (Willd. ex Schult.) DC.	Unha de gato	-
<i>Croton conduplicatus</i> Kunth	Quebra faca	-
<i>Loetia Apetala</i>	Pau piranha	A
<i>Astronium fraxinifolium</i> Schott	Gonçalavo	-
<i>Anacardium giganteum</i> Hancock ex Engl.	Cajuíte	A
<i>Tamarindus indica</i> L.	Tamarindo	C
<i>Commiphora leptophloeos</i> (Mart.) J.B.Gillett	Imburana	-
<i>Jatropha gossypifolia</i> L.	Pinhão roxo	-
<b>Nome científico</b>	<b>Nome popular</b>	<b>Tipos de uso</b>
<i>Cleome spinosa</i> L.	Mussambê	-
<i>Calliandra spinosa</i> Ducke.	Marizeira	-
<i>Ipomoea sericophylla</i> Meisn.	Jitirana	-
<i>Cephalocereus albispinus</i> (Salm-Dyck) Borg	Cabeça de velho	-
<i>Aspidosperma pyrifolium</i> Mart.	Pereiro	-
<i>Bauhinia forficata</i>	Pata-de-vaca	-
<i>Vitex gardneriana</i>	Jeramataia	A
<i>Cordia goeldiana</i>	Freijó	B
<i>Sapinus saponarea</i>	Sabonete	-
<b>Total de plantas citadas: 38</b>		

Tabela 1 - Plantas nativas citadas pelos moradores e seus respectivos tipos de uso  
Nota: Siglas para tipos de uso – A: Medicinal; B: madeireiro; C: Alimentício; -: sem uso citado.

Fonte: Elaborado pelo autor

Os entrevistados citaram conhecer 38 plantas e destas plantas 17 foram associadas a algum tipo de uso. Na Figura 5 são apresentados os tipos de uso citados para as plantas nativas.

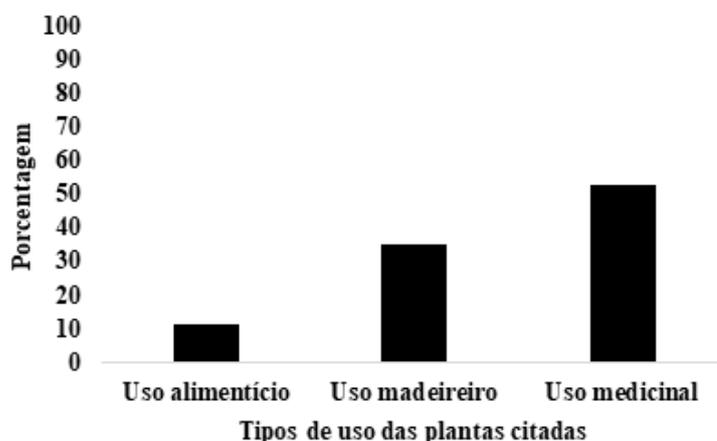


Figura 5 – Porcentagem de tipos de uso de plantas nativas na Comunidade Itans em Iguatu/CE

Dentre as formas de uso citadas teve um destaque para o uso medicinal com 53% de citações e uso madeireiro com 35,20%. As espécies de plantas nativas mais citadas foram a aroeira e o jucá para uso medicinal e para uso madeireiro pau-d'arco, sabiá e marmeleiro.

Também foi investigado quais plantas nativas da caatinga os sujeitos reconhecem através da flor. Desta forma, 29 plantas foram citadas e na Figura 6 são destacadas as espécies com mais citações.

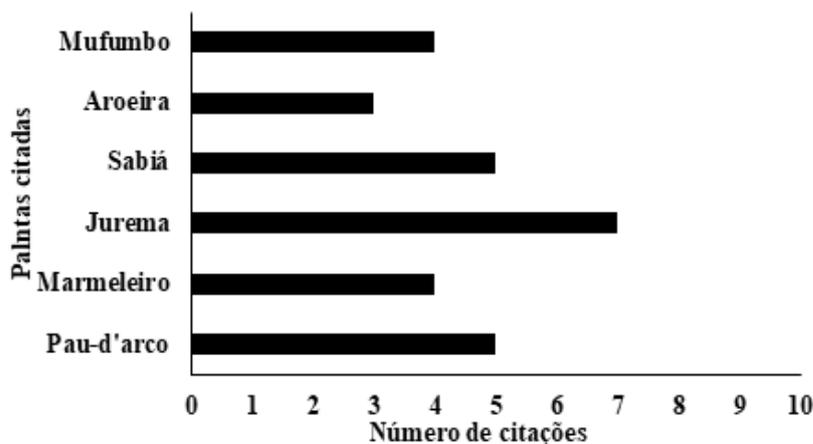


Figura 6 – Plantas nativas reconhecidas pela flor na Comunidade Itans em Iguatu/CE

O conhecimento tradicional sobre os recursos florais como atrativos para os polinizadores, o néctar foi o recurso mais conhecido (Figura 7). Apenas um dos entrevistados

citou pólen, enquanto que quatro justificaram as visitas como atividade responsável pela produção de mel, não exemplificando nenhum atrativo específico.

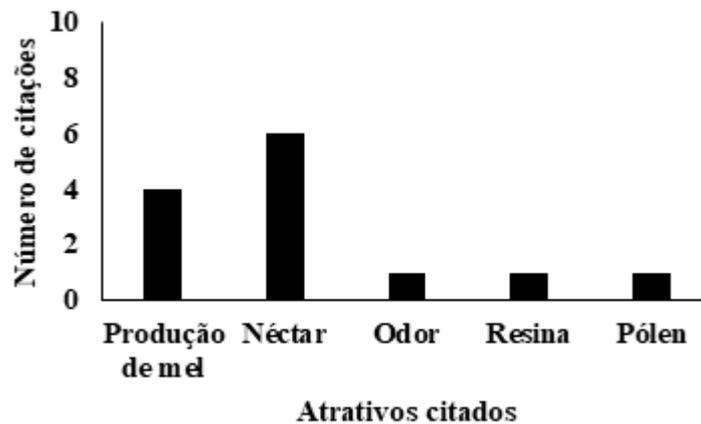


Figura 7: Atrativos de flores para atração de polinizadores citados na Comunidade Itans em Iguatu/CE

Sobre o conhecimento de duas espécies específicas ocorrentes na região, 60% responderam que conheciam *S. uniflora*, popularmente conhecida na comunidade como mata-pasto. Sobre sua utilização, 90% não fazem uso da planta e apenas um entrevistado relatou fazer uso medicinal.

Em relação aos visitantes florais, 50% disseram já ter visto algum visitante em flores de *S. uniflora*. Os tipos de visitantes citados foram abelhas, borboletas e formigas e quanto ao horário de visitas 20% responderam observar visitas durante a tarde, 10% pela manhã e 20% responderam já ter visto os visitantes em ambos os horários. Segundo os entrevistados a *S. uniflora* é encontrada em áreas de mata aberta, descampados ou capoeiras. A espécie *B. acmella* não foi reconhecida entre os entrevistados.

#### 4 | DISCUSSÃO

Na comunidade Itans todos os homens entrevistados são agricultores, enquanto as mulheres ocupam funções domésticas e outras profissões que não estão associadas ao trabalho no campo. Silva e Vieira (2016) destacam que o trabalho que exige maior esforço e uso de força é comumente realizado por homens, enquanto que as mulheres ficam quase que restritas ao trabalho doméstico. Este padrão é reforçado por Pasqualotto *et al.* (2016) que afirma que geralmente em comunidades rurais, as mulheres ocupam-se de encargos como plantio, colheita e transformação de produtos e cuidado das crianças.

Em sua maioria, os entrevistados disseram residir na comunidade desde a infância. A literatura aponta que o conhecimento adquirido pelo manejo do campo e plantio promove a agricultura familiar resultando numa contribuição para a permanência das gerações na comunidade (RIBEIRO; MELLO; BARROS, 2016). Conseqüentemente, com o manejo

da terra os agricultores se apropriam de um intrínseco conhecimento da natureza e do território, repassando-o ao longo das gerações (CALDAS *et al.*, 2019).

Nesse sentido, os produtores demonstraram conhecer a flora da região, bem como suas diversas utilidades. Entre as plantas mais citadas e seus respectivos usos destacou-se a utilização para fins medicinais, resultado encontrado por Lima-Nascimento e Ramos (2017). Outro estudo evidencia que idosos fazem maior uso medicinal de plantas, o que pode contribuir significativamente com estudos de produção de fármacos, por exemplo, a partir dos recursos vegetais nativos da caatinga (ALBERGARIA; SILVA; SILVA, 2019). A importância da transmissão desse conhecimento empírico entre gerações pode ser compreendida através da cultura regional e pela necessidade de tratar enfermidades justificadas pelos moradores mais antigos pelo difícil acesso a medicamentos industrializados (DANTAS; TORRES, 2019).

Quanto aos atributos relacionados à polinização em espécies nativas, os entrevistados deram relatos sobre a interação, relacionando a atração de polinizadores a recompensas florais como pólen, néctar, resina, odor e produção de mel. Essa narrativa corrobora com a literatura acerca da polinização em ambientes secos, onde tais recursos são ofertados pelas flores de caatinga (LEAL; LOPES; MACHADO, 2006; QUIRINO; MACHADO 2006).

*S. uniflora* foi reconhecida por 70% dos entrevistados. O gênero *Senna* apresenta distribuição cosmopolita e grande parte das espécies ocorre no continente americano (BORGES, 2010). Apesar da semelhança com *Senna obtusifolia* (mata-pasto liso), alguns dos entrevistados mencionaram que existiam dois tipos de mata-pasto, apontando diferenças entre folhas, flores e frutos e a ocorrência em áreas de descampado e pastagens. Abelhas foram lembradas por 80% dos entrevistados, sendo estes insetos destacadas na literatura pela sua importância como agentes polinizadores (FREITAS; IMPERATRIZ-FONSECA, 2005; SOUSA *et al.* 2007).

A espécie *B. acmella*, não foi reconhecida entre os entrevistados. Ainda existem lacunas de estudos ecológicos da espécie na literatura, visto que a espécie têm sido mais explorada quanto aos seus potenciais componentes químicos.

## 5 | CONCLUSÃO

Nossos dados evidenciam que o processo de polinização é percebido pelos moradores da comunidade. No entanto, tal percepção não ocorre nos dois modelos propostos, sobretudo no caso de espécies herbáceas. Encontramos um padrão oposto no qual houve um reconhecimento de *S. uniflora*, o que não ocorreu para *B. acmella*. Apesar disso, observamos que a maioria dos moradores conhecem recompensas florais, tais como pólen e néctar e agentes polinizadores, como também possuem um amplo conhecimento da flora local. Vale destacar que nossos dados não passaram por análises estatísticas o que pode limitar algumas de nossas afirmações. Sugerimos assim que

estudos futuros realizem investigações dessa natureza com análises mais robustas para elucidar tais questões.

## REFERÊNCIAS

- ALBERGARIA, E. T.; SILVA, M. V.; SILVA, A. G. **Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em comunidades rurais do município de Lagoa Grande, Pernambuco, Brasil.** *Revista Fitos*, v. 13, n. 2, p. 137–154, 2019. Disponível em: <http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/713/pdf>. Acesso em: 26 abr. 2020.
- ALMEIDA, N. M.; BEZERRA, T. T.; OLIVEIRA, C. R. S.; NOVO, R. R.; SIQUEIRA-FILHO, J. A.; OLIVEIRA, P. E.; CASTRO, C. C. **Breeding systems of enantiostylous Cassiinae species (Fabaceae, Caesalpinioideae).** *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, v. 215, p. 9-15, 2015. Disponível em: [encurtador.com.br/huDJM](http://www.com.br/huDJM). Acesso em: 25 abr. 2020.
- BUCHMANN, S. L. **Buzz pollination in Angiosperms.** In *Handbook of experimental pollination biology* (C.E. Jones & R.J. Little, eds.). Van Nostrand Scientific and Academic Editions, New York, p.73-113, 1983.
- CALDAS, A. L. T.; RIBEIRO, E. M.; LIMA, V. M. P.; DAYRELLI, C. A. **Agricultura e etnoconhecimento em comunidades rurais do Jequitinhonha mineiro.** *Anais*, p. 1-20, 2019. Disponível em: <http://www.abep.org.br/publicacoes/index.php/anais/article/viewFile/3351/3210>. Acesso em: 26 abr. 2020
- DANTAS, J. I. M.; TORRES, A. M. **Abordagem etnobotânica de plantas medicinais em uma comunidade rural do sertão alagoano.** *Diversitas Journal*, v. 4, n. 1, p. 39-48, 2019. Disponível em: [https://periodicos.ifal.edu.br/diversitas\\_journal/article/view/663](https://periodicos.ifal.edu.br/diversitas_journal/article/view/663). Acesso em: 26 abr. 2020.
- DRUMOND, M. A.; KILL, L. H. P.; LIMA, P. C. F.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, V. R.; ALBUQUERQUE, S. G.; NASCIMENTO, C. E. S.; CAVALCANTI, J. **Estratégias para o uso sustentável da biodiversidade da caatinga.** Embrapa Semiárido-Fôlder/Folheto/Cartilha (INFOTECA-E), 2000. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/134000/1/usosustentavel.pdf>. Acesso em: 27 abr. 2020.
- GARIGLIO, M. A.; SAMPAIO, E. V. S. B.; CESTARO, L. A.; KAGEYAMA, P. Y. **Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da caatinga.** 2010.
- GOMES, R. F.; SANTOS, H. S.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; PESSOA, O. D. L.; LOTUFO, L. V. C.; Ó PESSOA, C.; MORAES, M. O.; RODRIGUES, F. A. R. **Blainvillea rhomboidea: constituintes químicos e atividade citotóxica.** *Química Nova*, v. 33, n. 5, p. 1122-1125, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v33n5/22.pdf>. Acesso em: 27 abr. 2020.
- GOTTSBERGER, G.; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I. **Evolution of flower structures and pollination in Neotropical Cassiinae (Caesalpinaceae) species.** *Phyton*, 1988.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; CONTRERA, F. A. L.; KLEINERT, A. M. P. **A meliponicultura e a iniciativa brasileira dos polinizadores.** In: XV congresso brasileiro de apicultura e congresso brasileiro de meliponicultura, Natal. 2004. Disponível em: [http://www.webbee.org.br/projetos/bpi/pdfs/meliponicultura\\_bpi.pdf](http://www.webbee.org.br/projetos/bpi/pdfs/meliponicultura_bpi.pdf). Acesso em: 26 abr. 2020.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; CANHOS, D. A. L.; ALVES, D. A.; SARAIVA, A. M. **Polinizadores no Brasil: contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais.** [S.l.: s.n.], 2012.
- LEAL, F. C.; LOPES, A. V.; MACHADO, I. C. **Polinização por beija-flores em uma área de caatinga no Município de Floresta, Pernambuco, Nordeste do Brasil.** *Brazilian Journal of Botany*, v. 29, n. 3, p. 379-389, 2006. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010084042006000300005&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010084042006000300005&script=sci_arttext). Acesso em: 25 abr. 2020.

LEAL, I. R; LOPES, A. V; MACHADO, I. C; TABARELLI, M. **Plant–animal interactions in the caatinga: overview and perspectives**. In: Caatinga. Springer, Cham, p. 255-278. 2017.

MAIA, L. S; LEÃO, M. D. M; BARBOSA, M. G; SOUZA, S. A; COUTINHO, C. R; PASTORI, P. L. **Entomofauna diversity in areas of Caatinga under forest management in the semi-arid region of Ceará**. Comunicata Scientiae, 10(1), 10-20. 2019. Disponível em: <https://www.comunicatascientiae.com.br/comunicata/article/view/2422/785>. Acesso em: 27 abr. 2020.

MOREIRA, H. J. C; BRAGANÇA, H. B. **Manual de identificação de plantas infestantes**. Campinas: FMC, 2011. Disponível em: [encurtador.com.br/dvNU2](http://encurtador.com.br/dvNU2). Acesso em: 26 abr. 2020.

QUIRINO, Z. G. M; MACHADO, I. C. S. **Fenologia, síndromes de polinização e dispersão e recursos florais de uma comunidade de Caatinga no cariri paraibano**. 2006. Tese (Doutorado em Biologia vegetal) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006. Disponível em: [https://attena.ufpe.br/bitstream/123456789/406/1/arquivo2142\\_1.pdf](https://attena.ufpe.br/bitstream/123456789/406/1/arquivo2142_1.pdf). Acesso em: 26. abr. 2020.

RIBEIRO, S. C; MELO, N. D. P; BARROS, A. B. **Etnoconhecimento de pequenos agricultores tradicionais sobre plantas medicinais no tratamento de dores provocadas pelo trabalho**. Cadernos de Terapia Ocupacional, v. 24, n. 3, p. 563-574, 2016. Disponível em: <http://www.ccs.ufpb.br/nepfh/contents/documentos/artigos/fitoterapia/etnoconhecimento-de-pequenos-agricultores-tradicionais-sobre-plantas-medicinais-no-tratamento-de-dores-provocadas-pelo-trabalho.pdf>. Acesso em: 25 abr. 2020.

RICKETTS, T. H, REGETZ, J; STEFFAN-DEWENTER, I., CUNNINGHAM, S. A, KREMEN, C; BOGDANSKI, A; MORANDIN, L. A. **Efeitos da paisagem nos serviços de polinização de culturas: existem padrões gerais?**. Cartas de ecologia ,11 (5), 499-515. 2008.

SANTORO, F. R; NASCIMENTO, A. L. B., SOLDATI, G. T; FERREIRA JÚNIOR, W. S. F; ALBUQUERQUE, U. P. **Evolutionary ethnobiology and cultural evolution: opportunities for research and dialog**. Journal of ethnobiology and ethnomedicine, 14(1), 1. 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1186/s13002-017-0199-y.pdf>. Acesso em: 26 abr. 2020.

SOUZA, D. L; EVANGELISTA-RODRIGUES, A; CALDAS PINTO, M. S. **As abelhas como agentes polinizadores**. REDVET. Revista electrónica de Veterinária, v. 8, n. 3, 2007. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/636/63613302010.pdf>. Acesso em: 25 abr. 2020.

SPRING, O; VOGLER, B; ZIPPER, R; LOPES, J. I. C; VICHNEWSKI, W; DIAS, D. A; CUNHA, W. R. **Sesquiterpene lactones in Blainvillea rhomboidea**. Phytochemistry, v. 52, n. 1, p. 79-85, 1999. Disponível em: [encurtador.com.br/pxDZ4](http://encurtador.com.br/pxDZ4). Acesso em: 27 abr. 2020.

## AVALIAÇÃO DE TRABALHOS PUBLICADOS EM ENCONTROS UNIVERSITÁRIOS SOBRE O IMPACTO AMBIENTAL NO ESTADO DO CEARÁ, BRASIL

*Data de aceite: 01/07/2020*

*Data de submissão: 09/06/2020*

**Lydia Dayanne Maia Pantoja**

Universidade Estadual do Ceará

Fortaleza – Ceará

<http://lattes.cnpq.br/7749062886960077>

**Marcos Adelino Almeida Filho**

Universidade Federal Rural do Semi-Árido

Mossoró – Rio Grande do Norte

<http://lattes.cnpq.br/3256818623470388>

**Josiany Costa de Souza**

Instituto Federal de Educação, Ciência e  
Tecnologia do Ceará

Fortaleza – Ceará

<http://lattes.cnpq.br/7198370019008902>

**Lucas Farias Pinheiro**

Universidade Estadual do Ceará

Fortaleza – Ceará

<http://lattes.cnpq.br/0019234695312454>

**Manuella Maciel Gomes**

Universidade Federal do Ceará

Fortaleza – Ceará

<http://lattes.cnpq.br/3712212908024425>

**Isabelly Maria Barros de Lima**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre – Rio Grande do Sul

<http://lattes.cnpq.br/0217810698041593>

**Itatiaia de Souza Sampaio**

Universidade Estadual do Ceará

Fortaleza – Ceará

<http://lattes.cnpq.br/0923776486821164>

**RESUMO:** O Estado do Ceará apresenta vários biomas diferentes em virtude de suas características geomorfológicas e climáticas, dividindo-o em diversas unidades fitoecológicas, no qual cada uma possui fauna e flora adaptadas e específicas, bem como impactos ambientais diferentes devido a utilização dos recursos naturais. Diante disso, objetivou-se analisar os trabalhos focados em Impacto Ambiental publicados nos anais de um evento universitário de importância para o Estado do Ceará durante uma década (2008 a 2017). Para isso, os trabalhos foram levantados a partir do site de anais do evento e agrupados com informações sobre a instituição de ensino do autor principal, foco central do trabalho, instrumentos metodológicos, grande área do conhecimento, ambientes e localidades de realização da pesquisa. Mediante as buscas, identificou-se 129 trabalhos, em que a principal grande área do conhecimento foi de Ciências Exatas e da Terra (60,46%) e a principal instituição foi a Universidade Estadual do Ceará (94,57%). O

instrumento metodológico mais utilizado foi levantamento bibliográfico (57,36%). Os campos dentro da área de Impacto Ambiental mais predominantes foram impactos ambientais (46,51%) e impactos socioambientais (17,82%). Percebe-se que os trabalhos sobre Impacto Ambiental submetidos ao evento são escassos, o que pode ser devido a poucos cursos e disciplinas voltadas à área ambiental. Dentre os 129 trabalhos, 75 especificou o ambiente e a localidade. A maior quantidade de estudos ocorreu em Ambientes Aquáticos (45,33%), seguido pela Planície Litorânea (38,66%) e Serras e Chapadas (16%). As localidades mais frequentes foram no município de Fortaleza (25,33%) e no Rio Jaguaribe (12%). Apesar de as pesquisas serem maiores em certas regiões e ecossistemas, sugere-se que todos devem ser estudados, visando ter um panorama completo do Estado e compreender a abrangência destes impactos, culminando com a mitigação dos mesmos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Estudos Ambientais; Trabalhos Científicos; Análise documental; Ambientes Aquáticos; Nordeste.

## EVALUATION OF PAPERS PUBLISHED IN UNIVERSITY MEETINGS ON ENVIRONMENTAL IMPACT IN THE STATE OF CEARÁ, BRAZIL

**ABSTRACT:** The State of Ceará presents several different biomes due to its geomorphological and climatic characteristics, dividing it into several phytoecological units, in which each one has adapted and specific fauna and flora, as well as different environmental impacts due to the use of natural resources. Therefore, the objective was to analyze the works focused on Environmental Impact published in the annals of a university event of importance for the State of Ceará during a decade (2008 to 2017). For that, the works were gathered from the proceedings of the event and grouped with information about the main author's teaching institution, central focus of the work, methodological instruments, large area of knowledge, environments and locations where the research was carried out. Through the searches, 129 works were identified, in which the main area of knowledge was Exact and Earth Sciences (60.46%) and the main institution was the State University of Ceará (94.57%). The most used methodological instrument was a bibliographic survey (57.36%). The most predominant fields within the Environmental Impact area were environmental impacts (46.51%) and socio-environmental impacts (17.82%). It is noticeable that the works on Environmental Impact submitted to the event are scarce, which may be due to few courses and disciplines focused on the environmental area. Among the 129 works, 75 specified the environment and the location. The greatest number of studies occurred in Aquatic Environments (45.33%), followed by the Coastal Flatlands (38.66%), and Mountains and Plateaus (16%). The most frequent locations were Fortaleza (25.33%), and the Jaguaribe River (12%). Although the research is larger in certain regions and ecosystems, it is suggested that all of them should be studied, in order to have a complete picture of the State and understand the scope of these impacts, culminating in their mitigation.

**KEYWORDS:** Environmental Studies; Scientific Works; Documental Analysis; Brazilian Northeast.

## 1 | INTRODUÇÃO

Os Impactos Ambientais – IA, são alterações das funções ou propriedades de um ou mais componentes do ambiente, que podem ser causados por qualquer subproduto das atividades humanas podendo afetar de forma direta ou indireta o bem-estar, a saúde e a segurança da população (SPADOTTO, 2002; MUCELIN; BELLINI, 2008).

Percebe-se então, que essa intensa ação das atividades antropogênicas é a principal responsável pelos impactos negativos acometidos ao meio ambiente, no qual, vai aumentando de forma cumulativa e sem a devida gestão de serviços públicos (COSTA; PIRES, 2017).

O crescimento das cidades e o processo de urbanização nas últimas décadas estão entre os principais fatores desencadeadores do aumento dos impactos. Os fatores influenciadores disso, concernem à especulação imobiliária, acúmulo do capital e pressão do sistema produtivo, devolução de rejeitos e efluentes no meio ambiente, entre outros (BARBOSA *et al.*, 2012; ZANCHETI; HIDAKA, 2014). Tais atividades descaracterizam a paisagem natural do ambiente, formando áreas modificadas e degradadas, e que não garantem qualidade de vida para o indivíduo e/ou ao ambiente (ZANCHETI; HIDAKA, 2014; BARBOSA, 2016).

No Ceará, se tem alguns estudos sobre a temática de IA, dentre eles, podem ser destacados, os problemas socioambientais, com causa proveniente, por exemplo, de alguma indústria ou empreendimento que se instala na região (NUNES; BARRETO, 2019; LOPES *et al.*, 2017), bem como estudos referentes aos impactos encontrados em áreas naturais (MAIA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2019).

Observa-se que no Estado há vários ecossistemas diferentes em virtude de suas características geomorfológicas, estando relacionado com a modelagem de escudos cristalinos e sedimentares, bem como com as variações climáticas, dividindo-o em diversas unidades fitoecológicas, as quais possuem fauna e flora adaptada a esse ambiente. As principais formas de unidades de relevo são as que estão presente na Região Costeira, Planícies Fluviais, Chapadas, Depressão Sertaneja e Maciços residuais, cada uma dessas apresentando uma diversidade de formas de vegetação (MORO *et al.*, 2015). Sendo a Caatinga o ecossistema mais representativo no Estado, ocupando quase que a sua totalidade (BRASIL, 2016).

Os impactos podem ser desencadeados das mais variadas formas, e alguns desses podem ter relação, por exemplo, com a vegetação, gerando danos e prejuízos direto e indiretos no ecossistema local, uma vez que o ambiente serve como habitat para fauna e flora (ZABOTTO, 2019).

Dentro desse contexto, o presente estudo objetivou analisar os trabalhos focados em Impacto Ambiental, publicados nos anais de um evento universitário de importância para o

Estado do Ceará durante uma década (2008 a 2017), especificamente para verificar quais metodologias usadas, a grande área focada nas pesquisas, assim como quais ambientes e localidades prevalecem nas publicações.

## **2 | METODOLOGIA**

A pesquisa resulta de uma análise documental e quantitativa (PRODANOV; FREITAS, 2013), de trabalhos publicados em encontros anuais de um evento universitário de importância para o Estado do Ceará durante uma década (2008 a 2017).

Trata-se de um evento regional importante e agregador de várias Instituições de Ensino Superior do Estado do Ceará, fornecendo atividades direcionadas às ações de ensino, pesquisa e extensão aos alunos, docentes e comunidade. Diversos encontros acontecem simultaneamente no presente evento universitário, como de Iniciação Científica, Monitoria, Programa de Educação Tutorial (PET), Iniciação à Docência, Extensão, Estágio Supervisionado e Presidência Pedagógica, o que permite tanto aos alunos, quanto aos professores publicarem trabalhos referentes às suas pesquisas.

Além de aberto ao público, representa o maior evento científico e cultural da Instituição, promovendo diferentes atividades culturais, ação solidária, feira das profissões, palestras, mesas redondas, cursos e oficinas de curta duração, exposições, entre outros.

Para tal fim, foi realizado um levantamento de trabalhos a partir do site contendo os anais do evento, sendo o critério de busca, os seguintes descritores: impacto, impactos, impacto ambiental e impactos ambientais, apenas na língua portuguesa; e estes foram pesquisados inicialmente no campo de busca por títulos e posteriormente por palavra-chave.

Após buscas iniciais, os trabalhos levantados foram analisados e agrupados mediante informações em dois cenários, a saber: (i) instituição de ensino do autor principal, foco central do trabalho, instrumentos metodológicos e grande área do conhecimento, contemplando assim o perfil dos trabalhos; (ii) e posteriormente as localidades dos estudos, sendo então agrupados nas categorias Ambientes Aquáticos (rios, lagos, lacustre e estuários), Planície Litorânea (praia, dunas, litoral e zona costeira) e Serras e Chapadas, e também analisadas os locais mais frequentes onde foram realizados os estudos.

Como ferramenta de auxílio, utilizou-se o programa Microsoft Excel 2013 para a tabulação, análise e criação dos gráficos, sem seguida os dados foram apresentados e confrontados a luz da literatura atual e pertinente sobre a temática.

## **3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO**

No intuito de facilitar a compreensão e apresentação dos dados, os resultados a seguir foram divididos em duas categorias, sendo a primeira sobre o perfil dos trabalhos

encontrados nos anais dos encontros universitários, visando ressaltar e discutir aspectos referentes à instituição de ensino, foco, instrumentos metodológicos e área do conhecimento do estudo; e a segunda abordando o ambiente e localidade dos trabalhos.

### 3.1 Perfil dos estudos

Identificou-se com base em um total de 17 mil trabalhos publicados durante 2008 a 2017, 129 estudos envolvendo a temática de IA. Estes, foram distribuídos em 7 grandes áreas do conhecimento, predominando a de Ciências Exatas e da Terra (60,46%), tendo como a principal instituição participante a UECE (94,57%) (Figura 1).

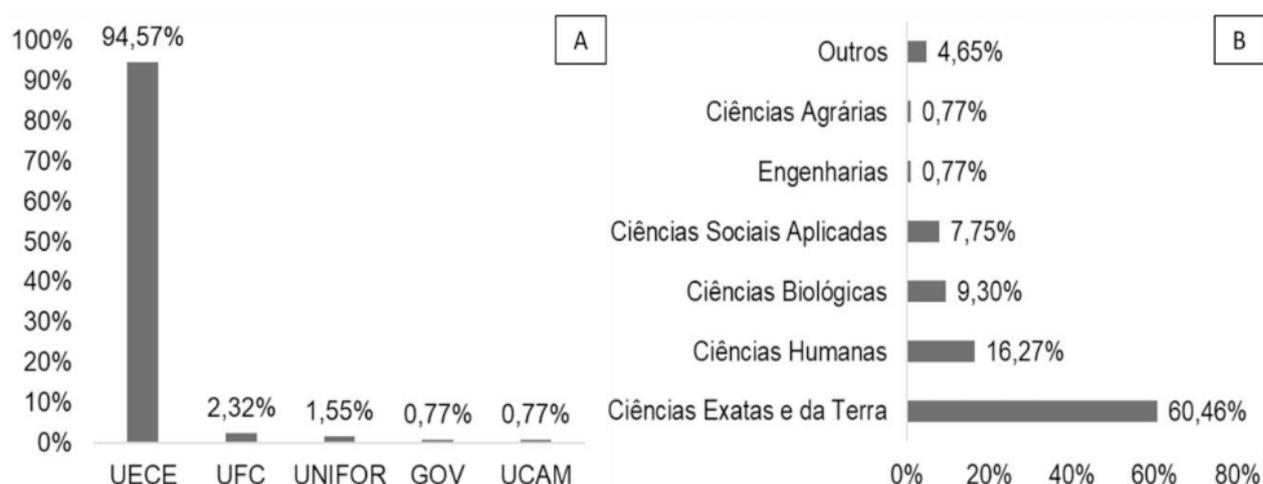


Figura 1 – Instituições de ensino participantes da pesquisa (A) e grandes áreas do conhecimento (B) dos trabalhos sobre Impactos Ambientais, publicados nos anais de um evento universitário de importância para o Estado do Ceará durante 2008 a 2017. Legenda: UFC – Universidade Federal do Ceará; UNIFOR – Universidade de Fortaleza; GOV – Governo Estadual do Ceará; UCAM - Universidade Cândido Mendes.

As Ciências Exatas e da Terra, obtida como a área com maior número de estudos, representa um campo bastante amplo de especialidades, muitas destas estão voltadas diretamente à questão ambiental, como é o caso da geografia, geologia e meteorologia, e outras que são utilizadas dos seus conhecimentos para estudos ambientais, como química e física.

Constatou-se nos trabalhos, a utilização de um ou mais instrumentos metodológicos, onde o mais usado foi o levantamento bibliográfico (57,36%), e os demais podem ser observados na Figura 2.

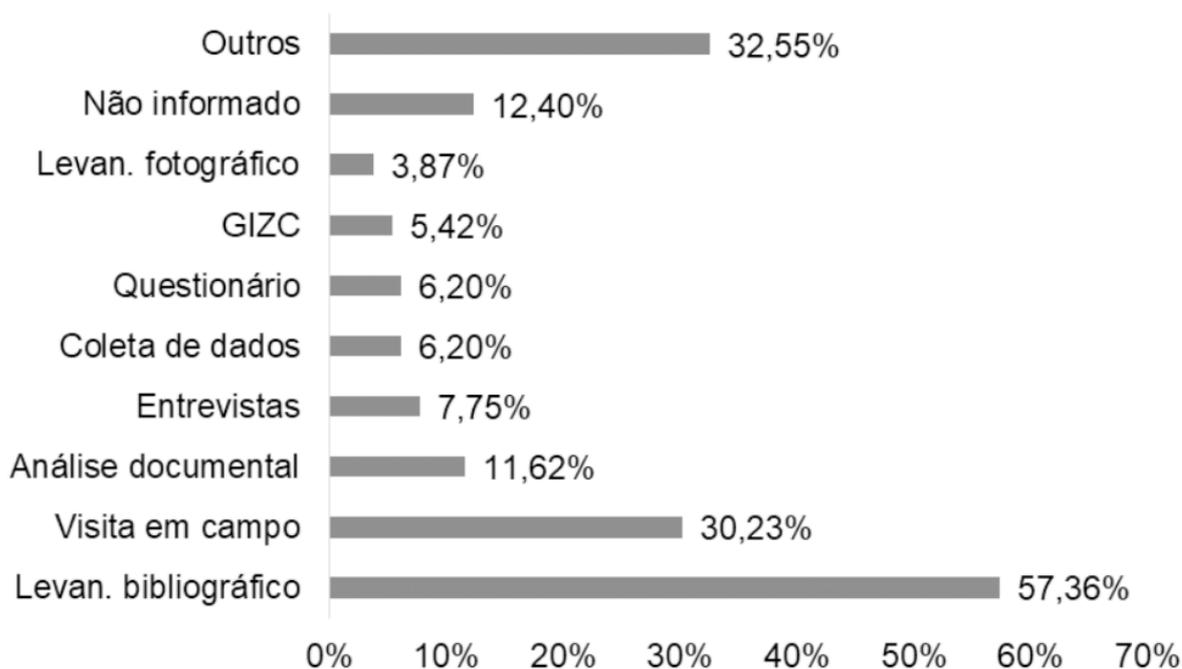


Figura 2 – Instrumentos metodológicos utilizados nos trabalhos envolvendo Impactos Ambientais, publicados nos anais de um evento universitário de importância para o Estado do Ceará durante 2008 a 2017. Legenda: Levan. – Levantamento; GIZC – Gestão Integrada da Zona Costeira.

O levantamento bibliográfico é uma importante metodologia de estudo, que visa reconhecer a produção do conhecimento científico acerca de determinada temática, e possibilita avaliar as principais vertentes da pesquisa, uma vez que será identificado os pontos discutidos, e o que está sendo publicado e gerado de conhecimento (TREINTA *et al.*, 2014).

Já o segundo instrumento encontrado com maior relevância nos achados, caracterizado pela pesquisa de campo, permite aos pesquisadores a coleta de dados em condições reais e com diferentes variáveis (PEREIRA *et al.*, 2018). A partir disso, é possível adquirir de forma espontânea, informações e/ou conhecimentos sobre a temática ou hipótese estudada, registrando aspectos relevantes e suas relações (PRODANOV; FREITAS, 2013).

Neste momento, vale salientar para a importância da diversificação de instrumentos metodológicos para abranger o máximo de dados, informações e diagnósticos sobre os IA no Ceará, assim foi evidenciado na análise dos estudos apresentados e desenvolvidos pela Instituição mais participante, a UECE.

Observou-se, trabalhos abrangendo um ou mais campos dentro da área de IA, onde foram agrupados nas diferentes categorias, havendo a um maior número de pesquisas envolvendo impactos ambientais (46,51%) e impactos socioambientais (17,82%) (Tabela 1).

<b>Categorias</b>	<b>Frequência absoluta</b>	<b>Frequência relativa</b>
Impactos ambientais	62	46,51%
Impactos socioambientais	23	17,82%
Uso e ocupação	15	11,62%
Degradação e alteração ambientais	14	10,85%
Impactos do turismo	5	3,87%
Gerenciamento de resíduos	4	3,1%
Análise Geoambiental	3	2,32%
Territorialização	1	0,77%
Outras categorias	12	9,3%

Tabela 1 – Campos dos trabalhos de impactos ambientais encontrados a partir da análise dos anais de um evento universitário de importância para o Estado do Ceará durante 2008 a 2017.

O IA se torna o principal achado dentro do presente estudo, o que pode ser justificado pelo crescente número de pesquisas na área ambiental, que vem despertando interesse em muitos pesquisadores ao redor do mundo, inclusive no Brasil. Isso está relacionado, possivelmente, aos constantes problemas que vem surgindo, muitos ocasionados ou intensificados pela ação antrópica na natureza (TRIERWEILLER *et al.*, 2014).

Segundo Gorayeb, Silva e Meireles (2005) os principais problemas causados pela ação antrópica e pelo mau uso dos recursos naturais, são a poluição de corpos hídricos através de esgotos clandestinos, destruição da vegetação nativa, principalmente pelas queimadas, interferindo assim, principalmente, na dinâmica do ecossistema e na biodiversidade local.

Para Vasconcelos e Coriolano (2008, p. 262), impacto socioambiental “é a reação na sociedade ou no meio ambiente a uma ação humana”. No Ceará, é possível observar um exemplo importante de impacto socioambiental associado à atividade turística, que tanto pode ser positivo, quanto negativo. No município de Fortaleza-CE, por exemplo, cidade com diversos atrativos turísticos naturais e culturais, entretanto, por ser uma atividade recente e com pouco planejamento, já é observado a presença de fortes IA resultantes dessas atividades elaboradas, como a deterioração natural de bens turísticos e culturais (BASTOS, 2012).

Para além das questões supracitadas, que também perpassam pelo âmbito do uso e ocupação do solo no que diz respeito tanto as áreas urbanas, quanto rurais, há muitas vezes descontrolado ou irregularidade durante esses processos. Isto, compreende fatores que dependem da tipologia, topografia, hidrografia e forma de ocupação, mas que envolvem ações com influência da especulação imobiliária, sistema viário e de transporte, redes de infraestrutura, equipamentos e prestação de serviços (RIO DE JANEIRO, 2009).

Tal situação ocorre historicamente no Ceará, e em virtude de sua diversidade de características de formação física, geográfica e ambiental, gera múltiplos impactos. Por exemplo, quando analisados os estudos realizados no Estado, pode ser destacado, em

diferenças localidades impactos advindos da degradação e substituição da vegetação natural pela produção agrícola (OLIVEIRA *et al.*, 2017; FALCÃO SOBRINHO; NASCIMENTO NETO; FALCÃO, 2019), uso e ocupação de bacias hidrográficas (PINHEIRO *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2019) e do litoral (PESSOA *et al.*, 2017; PORTELA; FREIRE; MORAIS, 2017).

Dessa forma, o IA pode ser motivado por vários fatores, como exemplo, a ação da mineração e o desflorestamento, que geram impactos tanto no meio biótico quanto no abiótico. Estes impactos, provocam alterações na dinâmica das atividades desempenhadas pelas pessoas, como também no local que sofre o impacto (SÁNCHEZ, 2008; LEITE; GONÇALVES-FUJACO, 2013).

### 3.2 Localidade dos estudos

Dentre os 129 trabalhos avaliados, 75 (58,14%) especificaram a localidade do estudo, com uma média de cerca de 7 a 8 trabalhos por ano, sendo constatado que a maior quantidade de pesquisas ocorre em Ambientes Aquáticos (45,33%), seguido pela Planície Litorânea (38,66%) e Serras e Chapadas (16%).

Um dos problemas resultantes do recuo da linha de costa, está relacionado à erosão que se estende por toda a extensão do litoral cearense. Tal situação, se dá pela ação do ser humano que acaba acelerando esse processo, o que pode ser evidenciado em diversas praias do Estado e nas margens dos estuários (MEIRELES *et al.*, 2006; MEIRELES, 2008). Isto pode, por exemplo, justificar, o resultado do presente estudo, onde mais trabalhos foram encontrados para os Ambientes Aquáticos e Planície Litorânea, devido a vulnerabilidade do ambiente e a intensa atividade humana.

Conjuntamente, o sistema de saneamento e coleta de lixo precários acabam acarretando ao canal estuarino e aquífero altas concentrações de poluição, principalmente pelos lançamentos de efluentes domiciliares (MEIRELES, 2008). Segundo a Organização das Nações Unidas - ONU (2018), anualmente cerca de 200 milhões de toneladas de resíduos e dejetos urbanos são lançados irregularmente nos ambientes aquáticos.

Por exemplo, o litoral do Ceará apresenta enormes atividades turísticas, principalmente pela quantidade de praias existentes, como no município de Aquiraz, onde possui vários hotéis, condomínios e resorts. Tal localidade não apresenta sistema de saneamento básico, onde os esgotos gerados por esses empreendimentos são destinados a fossas sépticas, podendo assim gerar prejuízos ao meio ambiente, como ao aquífero das dunas, devido a implantação errônea dessas fossas (ARAÚJO *et al.*, 2018).

As Serras, Chapadas e Planaltos, conhecidas por serem áreas de exceção, apresentam particularidades climáticas positivas que favorecem e se diferenciam de outros ambientes. Essas localidades, devido às suas condições de solo e clima ameno, acabam recebendo atenção e sendo impactadas por atividades que marcam a paisagem, e apesar de abrigarem muitas vezes Unidades de Conservação, a proteção não se torna efetiva,

havendo a instalação e desenvolvimento de indústrias, extração mineral, desmatamento, poluição, agricultura, entre outras, como é o caso da situação da Serra da Aratanha, que contempla uma Área de Proteção Ambiental – APA (BANDEIRA *et al.*, 2016; FREIRES *et al.*, 2017).

Quanto às áreas de abrangência dos trabalhos, obteve-se um total de 30 localidades do Ceará, sendo os mais frequentes: município de Fortaleza (25,33%) e no Rio Jaguaribe (12%) (Figura 3). Segundo o Conselho de Políticas e Gestão do Meio Ambiente - CONPAM (2014), Fortaleza é um dos municípios do estado do Ceará que mais geram resíduos sólidos urbanos, implicando em um grande problema para o setor público e gerando preocupações com o meio ambiente.

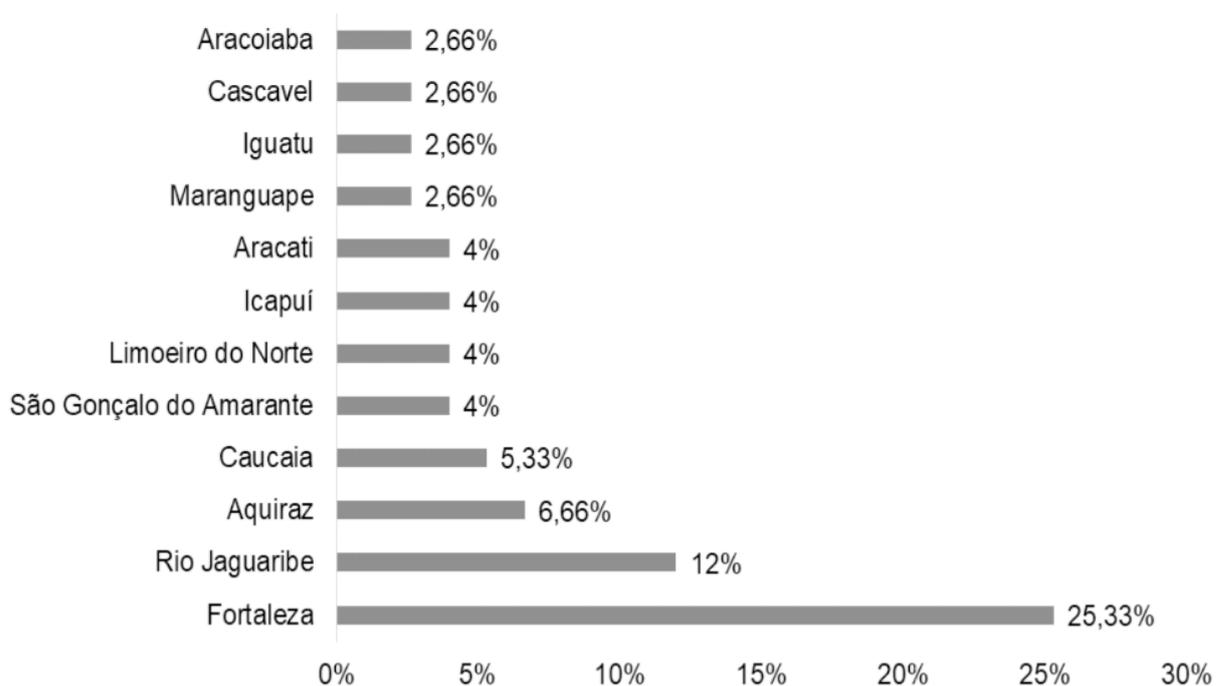


Figura 3 – Localidades de abrangência dos trabalhos publicados sobre a temática de impactos ambientais presentes nos anais de um evento universitário de importância para o Estado do Ceará durante 2008 a 2017.

Ainda, a capital cearense apresenta outras problemáticas que acabam afetando o ambiente e gerando impacto. Devido a sua localização no litoral, tornou-se um polo turístico e atrativo, na qual a especulação imobiliária veio crescendo durante os anos e gerando diversas alterações no ambiente devido à essa ocupação, muitas vezes sem planejamento, pois também foram instaladas no local, comunidades de baixa renda (MAGALHÃES; SILVA, 2009). Dentre estas mudanças observadas no ecossistema e na paisagem, vale ressaltar as alterações de dunas e remoção da vegetação nativa, construção de prédios, poluição, pavimentação e aplainamento, ocupação indevida do solo e recursos hídricos.

O Rio Jaguaribe, segunda localidade mais incidente com estudos de IA, é considerado

um local de grande importância hídrica para todo o Ceará. O Rio desemboca em uma região de intensa atividade turística e em uma APA, isso pode ser um dos fatores que faz com que este ambiente venha sofrendo interferência da ação do homem, e cada vez com potencial de causar mais danos à integridade do local para gerações futuras (PANTALENA; MAIA, 2013).

Uma das problemáticas relevantes nesse ambiente que vem sendo observado há muitos anos e que ainda persiste, é a ocupação descontrolada das suas margens, logo o local não apresenta o básico de infraestrutura, o que faz com que seja gerado mais prejuízos ambientais (RAFAEL; SOUZA, 2002).

Os ambientes aquáticos e o município de Fortaleza-CE foram as áreas de maior estudo na última década, isso se deve principalmente tanto a questões de uso e ocupação intensiva nessas áreas, bem como o processo de urbanização nos últimos tempos. Tais atividades vêm causando danos aos ecossistemas envolvidos, como exemplo, a redução de áreas naturais, lançamentos de dejetos em locais indevidos e proliferação de lixo no entorno dos corpos d'água que acabam por ter fim dentro destes ambientes.

#### 4 | CONCLUSÃO

Constatou-se que os trabalhos sobre IA submetidos ao evento são escassos, o pode ser, possivelmente, resultante de diferentes fatores, como poucas linhas de pesquisa, escassez de pesquisadores interessados na área, falta de mídia sobre o assunto, falta de interesse político, além de não haver no evento, um segmento específico para trabalhos neste campo.

Obteve-se ainda, que a frequência dos estudos de Impactos Ambientais vai estar diretamente relacionado às ações ambientais desenvolvidas em determinada área, em que, neste caso, para o estado do Ceará, o maior número de pesquisas foi relatado para os ambientes aquáticos e o município de Fortaleza-CE, ao ser analisado o período de 2008 a 2017.

Apesar de as pesquisas serem maiores em certos municípios e ecossistemas, sugere-se que todos devem ser devidamente estudados, para que assim possa ser realizado um panorama da distribuição de estudos em todo o Estado, compreendendo estes impactos pesquisados ao passo que se adquire maiores informações para o conhecimento da sociedade e possível mitigação desses problemas.

#### REFERÊNCIAS

ARAÚJO, K. V.; CAVALCANTE, I. N.; OLIVEIRA, R. M.; SILVA, M. P.; LIMA NETO, I. O. Impactos causados ao aquífero dunas pela ausência de saneamento na zona costeira de Aquiraz, Ceará. **Cadernos de Geociências**, v. 14, n. 1-2, p. 46-51, 2018.

- BANDEIRA, T. V.; OLIVEIRA, Í. P. A transformação na paisagem causada pela atividade mineradora na Serra da Monguba/CE. **Revista de Geociências do Nordeste**, v. 2, n. esp., p. 1221-1230, 2016.
- BARBOSA, E. M.; BARATA, M. M. L.; HACON, S. S. A. Saúde no licenciamento ambiental: uma proposta metodológica para a avaliação dos impactos da indústria de petróleo e gás. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 2, p. 299-310, 2012.
- BARBOSA, W. C. S. Consequências socioambientais da expansão urbana desordenada: um estudo de caso da vila da ressurreição em Teresina-PI. **Revista Equador**, v. 5, n. 3, p. 162-180, 2016.
- BASTOS, C. R. **Avaliação dos impactos socioeconomicos do turismo na região metropolitana de Fortaleza**. 2012. 349 f. Tese (Doutor em Planificación y Desarrollo Regional) – Universitat de Barcelona, Facultat de Geografia i Historia, Barcelona, 2012.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Ceará: Inventário Florestal Nacional: principais resultados**. Brasília: MMA, 2016.
- CONSELHO DE POLÍTICAS E GESTÃO DO MEIO AMBIENTE - CONPAM. **Plano Estadual de Resíduos Sólidos do Estado do Ceará**. Fortaleza, Ceará, 2014. Disponível em: <[http://www.conpam.ce.gov.br/attachments/article/44259/Caderno%20Aspec%20Econ%20\\_29dez%20corrigido.pdf](http://www.conpam.ce.gov.br/attachments/article/44259/Caderno%20Aspec%20Econ%20_29dez%20corrigido.pdf)>. Acesso em: 25 ago. 2018.
- COSTA, M. I. F.; PIRES, M. G. Levantamento dos impactos ambientais em áreas de preservação permanentes (APPS) urbanas em Porangatu – GO. **Revista Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v. 13, n. 6, p. 135-157, 2017.
- FALCÃO SOBRINHO, J.; NASCIMENTO NETO, J. N.; FALCÃO, C. L. C. Análise do uso e ocupação do solo em um ambiente úmido em meio ao semiárido cearense: Serra de Uruburetama. **Revista de Geociências do Nordeste – RGNE**, v. 5, n. esp., p. 42-53, 2019.
- FREIRES, E. V.; TEIXEIRA, C. P. B.; DUARTE, C. R.; GOMES, D. D. M. Análise da expansão urbana no entorno da APA da Serra da Aratanha/CE. In: CONGRESSO NACIONAL DE GEOGRAFIA FÍSICA, 1, 2017, Campinas. **Anais...** Campinas: SP, 2017.
- GOYABE, A.; SILVA, E. V.; MEIRELES, A. J. A. Impactos Ambientais e propostas de manejo sustentável para a planície flúvio-marinha do Rio Pacoti- Fortaleza/Ceará. **Sociedade & Natureza**, v. 17, n. 33, p. 143-152, 2005.
- LEITE, M. G. P.; GONÇALVES-FUJACO, M. A. A atividade de beneficiamento de quartzitos na cidade de Ouro Preto-Brasil: características gerais e principais impactos ambientais. **Economia, Sociedad y Territorio**, v. 13, n. 41, p. 227-243, 2013.
- LOPES, S. S.; SANTOS, A. R.; MELO, J. M. G.; FARIAS, F. G. Ventos de mudança: políticas públicas e impactos ambientais no setor eólico cearense. **EEDIC – Encontro de Extensão, Docência e Iniciação Científica**, v. 4, n. 1, 2017.
- MAGALHÃES, G. B.; SILVA, E. V. Análise Geoambiental e impactos ambientais nas dunas da Barra do Ceará – CE/Brasil. In: ENCONTRO DE GEOGRAFOS DA AMÉRICA LATINA, 12, 2009, Montevideo. **Anais...** Montevideo: 2009.
- MAIA, R. C.; SOUZA, K. N. S.; BENEVIDES, J. A. J.; AMORIM, V. G.; SOUSA, R. M. S. Impactos ambientais em manguezais no Ceará: causas e consequências. **Revista Conexões – Ciências e Tecnologia**, v. 13, n. 5, p. 69-77, 2019.
- MEIRELES, A. J. A. Impactos ambientais decorrentes da ocupação de áreas reguladoras do aporte de areia: a planície Costeira da Caponga, município de Cascavel, litoral leste cearense. **Revista Franco-Brasileira de Geografia**, v. 2, n. 2, 2008.

- MEIRELES, A. J.; SILVA, E. V.; THIERS, P. R. L. Os campos de dunas móveis: fundamentos dinâmicos para um modelo integrado de planejamento e gestão da Zona Costeira. **Revista GEOUSP**, v. 20, p. 101-119, 2006.
- MORO, M. F.; MACEDO, M. B.; MOURA-FÉ, M. M.; CASTRO, A. S. F.; COSTA, R. C. Vegetação, unidades fitoecológicas e diversidade paisagística do estado do Ceará. **Rodriguésia**, v. 66, n. 3, p. 717-743, 2015.
- MUCELIN, C. A.; BELLINI, M. Lixo e impactos ambientais perceptíveis no ecossistema urbano. **Sociedade & Natureza**, v. 20, n. 1, p. 111-124, 2008.
- NUNES, A. B. A.; BARRETO, T. M. L. Avaliação de impactos da indústria cerâmica do Polo de Russas – CE. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 30., 2019, Natal. **Anais...** Natal: 2019.
- OLIVEIRA, F. L. S.; SILVA, C. A.; SILVA, E. E. S.; ALMEIDA, L. Q. Classificação dos diferentes tipos de uso do solo nos sistemas ambientais no município de Pacoti, Ceará. In: CONGRESSO NACIONAL DE GEOGRAFIA FÍSICA, 1., 2017, Campinas. **Anais...** Campinas, SP: Unicamp, 2017.
- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS – ONU/BRASIL. **Doenças**. 2018. Disponível em: <[https://nacoesunidas.org/?post\\_type=post&s=doen%C3%A7as](https://nacoesunidas.org/?post_type=post&s=doen%C3%A7as)>. Acesso em: 25 ago. 2018.
- PANTALENA, A. F.; MAIA, L. P. Marcas da ação antrópica na história ambiental do Rio Jaguaribe, Ceará, Brasil. **Revista de Gestão Costeira Integrada**, v. 14, n. 3, p. 459-469, 2014.
- PEREIRA, A. S.; SHITSUKA, D. M.; PARREIRA, F. J.; SHITSUKA, R. **Metodologia da Pesquisa Científica**. Santa Maria, RS: UFSM, NTE, 2018.
- PESSOA, P. R. S.; PINHEIRO, L. S.; MORAIS, J. O.; ALVES, A. B. Processo de uso e ocupação no estuário do Rio Acaraú – Ceará e áreas adjacentes, uma análise multitemporal das formas de uso. In: CONGRESSO NACIONAL DE GEOGRAFIA FÍSICA, 1., 2017, Campinas. **Anais...** Campinas, SP: Unicamp, 2017.
- PINHEIRO, A. F. C.; PINHO, E.; CAVALCANTE, I. N.; GARCÊS, A. S.; OLIVEIRA, R. M. Captação de água subterrânea na zona aluvionar do Rio Jaguaribe e sua relação com o uso/ocupação do solo em São João do Jaguaribe – Ceará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS, 20., 2018, Campinas. **Anais...**, Campinas, SP: 2018.
- PORTELA, J. P.; FREIRE, G. S. S.; MORAIS, M. V. A. R. Análise do uso e ocupação do litoral de São Gonçalo do Amarante – Ceará – Brasil. **Revista de Geociências do Nordeste**, v. 3, n. 2, p. 2830-2841, 2017.
- PRODANOV, C. C.; FREITAS, E. C. **Metodologia do trabalho científico: métodos e técnicas da pesquisa e do trabalho acadêmico**. 2. ed. Rio Grande do Sul, RS: Editora da Universidade Freevale, 2013. 277 p.
- RAFAEL, R. L.; SOUZA, G. U. S. Poluição do Rio Jaguaribe. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA, 1, 2002, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa-PB: 2002.
- RIO DE JANEIRO. **Estudo de Impacto de Vizinhança – EIV: Operação Urbana Consorciada da Região do Porto do Rio, Situação Atual e Futura, Uso e Ocupação do Solo**. 2009. Disponível em: <<https://www.portomaravilha.com.br/conteudo/estudos/impacto-a-vizinhaca/V.%20Situacao%20Atual%20e%20Futura%205.%20Uso%20e%20Ocupacao%20do%20Solo.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2020.
- SÁNCHEZ, L. E. **Avaliação de impactos ambientais: conceitos e métodos**. São Paulo: Oficina de Textos. 2008.
- SILVA, R. M.; ANDRADE, D.; MOREIRA, A. G.; SILVA, A.; STEFANUTTI, R. Identificação dos impactos ambientais provocados pelo desmatamento da carnaúba na comunidade de Altinho no município de Tabuleiro do Norte – Ceará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 30., 2019, Natal. **Anais...** Natal: 2019.

SOUZA, M. A.; OLIVEIRA, F. F. P.; LUCAS, R. S.; LIMA, E. C. Análise geomorfológica uso e ocupação de bacias semiáridas do norte do estado do Ceará: estudo de caso da bacia hidrográfica do Rio Aracati Mirim, Itarema/CE. **Revista Homem, Espaço e Tempo**, v. 13, n. 2, p. 82-96, 2019.

SPADOTTO, C. A. **Classificação de Impacto Ambiental**. Comitê de Meio Ambiente, Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas. 2002. Disponível em: <<http://www.cnpma.embrapa.br/herbicidas/>>. Acesso em: 25 ago. 2018.

TREINTA, F. T.; FARIAS FILHO, J. R.; SANT'ANNA, A. P.; RABELO, L. M. Metodologia de pesquisa bibliográfica com a utilização de método multicritério de apoio à decisão. **Production**, v. 24, n. 3, p. 508-520, 2014.

TRIERWEILLER, A. C.; CAMPOS, L. M. S.; CARVALHO, D. N.; SANTOS, T. H. S.; BORNIA, A. C.; PEIXE, B. C. S. Gestão ambiental: levantamento da produção científica brasileira em periódicos de Engenharia de Produção. **Production**, v. 24, n. 2, p. 435-450, 2014.

VASCONCELOS, E. P.; CORIOLANO, L. N. M. T. Impactos Sócio-Ambientais no Litoral: Um Foco no Turismo e na Gestão Integrada da Zona Costeira no Estado do Ceará/Brasil. **Revista Gestão Costeira Integrada**, v. 8, n. 2, p 259-275, 2008.

ZABOTTO, A. R. **Estudos sobre Impactos Ambientais**: Uma abordagem contemporânea. Botucatu: FEPAF, 2019.

ZANCHETI, S. M.; HIDAKA, L. T. F. **A declaração de significância de exemplares da arquitetura moderna**. Olinda, PE: Centro de Estudos Avançados da Conservação Integrada, 2014. 18 p.

## **SOBRE O ORGANIZADOR**

**EDSON DA SILVA:** Possui graduação em Fisioterapia pela Fundação Educacional de Caratinga (2001). Obteve seu título de Mestre (2007) e o de Doutor em Biologia Celular e Estrutural pela Universidade Federal de Viçosa (2013). É especialista em Tecnologias Digitais e Inovação na Educação pelo Instituto Prominas (2020) e em Educação em Diabetes pela Universidade Paulista (2017). Realizou cursos de aperfeiçoamento em Educação em Diabetes pela parceria ADJ Diabetes Brasil, *International Diabetes Federation* e Sociedade Brasileira de Diabetes (2018). É professor e pesquisador da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, desde 2006, lotado no Departamento de Ciências Básicas (DCB) da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde (FCBS). Ministra disciplinas de Anatomia Humana para diferentes cursos de graduação. No Programa de Pós-Graduação em Saúde, Sociedade e Ambiente atua na linha de pesquisa Educação, Saúde e Cultura. É vice-coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, no qual atua nas áreas de Nutrição e Saúde Coletiva. É líder do Grupo de Estudo do Diabetes credenciado pelo CNPq no Diretório dos Grupos de Pesquisa no Brasil. Desde 2006 desenvolve ações interdisciplinares de formação em saúde mediada pela extensão universitária, entre elas várias coordenações de projetos locais, além de projetos desenvolvidos em Operações do Projeto Rondon com atuações nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil. É membro da Sociedade Brasileira de Diabetes, membro de corpos editoriais e parecerista *ad hoc* de revistas científicas nacionais e internacionais da área da saúde. Tem experiência na área da Saúde, atuando principalmente nos seguintes temas: Anatomia Humana; Diabetes *Mellitus*; Processos Tecnológicos Digitais e Inovação na Educação em Saúde; Educação, Saúde e Cultura.

## ÍNDICE REMISSIVO

### A

Ambientes Aquáticos 150, 152, 156, 158

Análise Documental 150, 152

Arbovírus 28, 29

Áreas Modificadas 107, 151

Asparaginase 1, 2, 3, 4, 5

Atividades Biológicas 32

Atributos Florais 107, 110

### B

Biocatalisador 92

Biodiversidade 92, 125, 147, 155

Biomassa Lignocelulósica 43

### C

Caatinga 99, 100, 101, 102, 106, 107, 108, 109, 110, 113, 114, 137, 138, 139, 144, 146, 147, 148, 151

Células Tumerais 1, 2, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 27

Células Tumerais de Ehrlich 17, 27

Chloroleucon Dumosum 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105

Coagulação 7, 8

Conhecimento Tradicional 138, 139, 142, 144

Crescimento de Raiz 99, 100, 102

Criopreservação 17, 18, 19, 20, 25, 26, 27

### D

Dieta 125, 130, 135

### E

Ecologia 114, 115, 125, 135, 136, 148

Enzimas 3, 4, 7, 43, 47, 48, 49, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 75, 76, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 98, 104

Estudos Ambientais 150, 153

### F

Fermentação Submersa 80, 82, 85, 88

Flavivírus 28, 29, 30

## I

Impactos Ambientais 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 157, 158, 159, 160, 161

Inibidores de Proteases 7, 8

Intoxicação Por Plantas 116, 118

Inventário 116, 159

## L

Lectina 32

Leucemia 1, 2

## M

método do Peso da Gota 80

MicroRNAs 28, 29, 30

Mycothermus Thermophilus 43, 44, 49, 53, 54, 55, 58, 59, 60, 62, 63, 64

## N

Nordeste 97, 104, 105, 110, 147, 150, 159, 160, 162

## P

Pastagem 108, 109, 116, 118, 122

Plantas 16, 45, 99, 101, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 110, 112, 116, 117, 118, 121, 122, 123, 124, 137, 138, 139, 142, 143, 144, 146, 147, 148, 161

Polinização 106, 107, 108, 110, 111, 113, 114, 115, 137, 138, 139, 140, 141, 146, 147, 148

Proteases 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 33, 72

Proteína 1, 3, 4, 5, 28, 32, 70, 117

Proteus Vulgaris 1, 2, 3, 4, 37

## R

Reações Químicas 92, 93

Recursos Florais 138, 144, 148

## S

Substâncias Húmicas 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105

Sulfeto de Hidrogênio 67, 68

Sumo 1, 2, 3, 4, 5

## T

Tensão Superficial 80, 83, 84, 85, 86, 87, 88

Trichoderma Reesei 43, 44, 49, 51, 52, 55, 57, 58, 61, 62, 64, 65

Tumor 17, 18, 19, 20, 21, 25, 26, 27, 28, 29, 37, 39, 42

# Tópicos Multidisciplinares em Ciências Biológicas 3

[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br) 

[contato@atenaeditora.com.br](mailto:contato@atenaeditora.com.br) 

[@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora) 

[www.facebook.com/atenaeditora.com.br](https://www.facebook.com/atenaeditora.com.br) 

 **Atena**  
Editora

Ano 2020

# Tópicos Multidisciplinares em Ciências Biológicas 3

[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br) 

[contato@atenaeditora.com.br](mailto:contato@atenaeditora.com.br) 

[@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora) 

[www.facebook.com/atenaeditora.com.br](https://www.facebook.com/atenaeditora.com.br) 

 **Atena**  
Editora

Ano 2020