

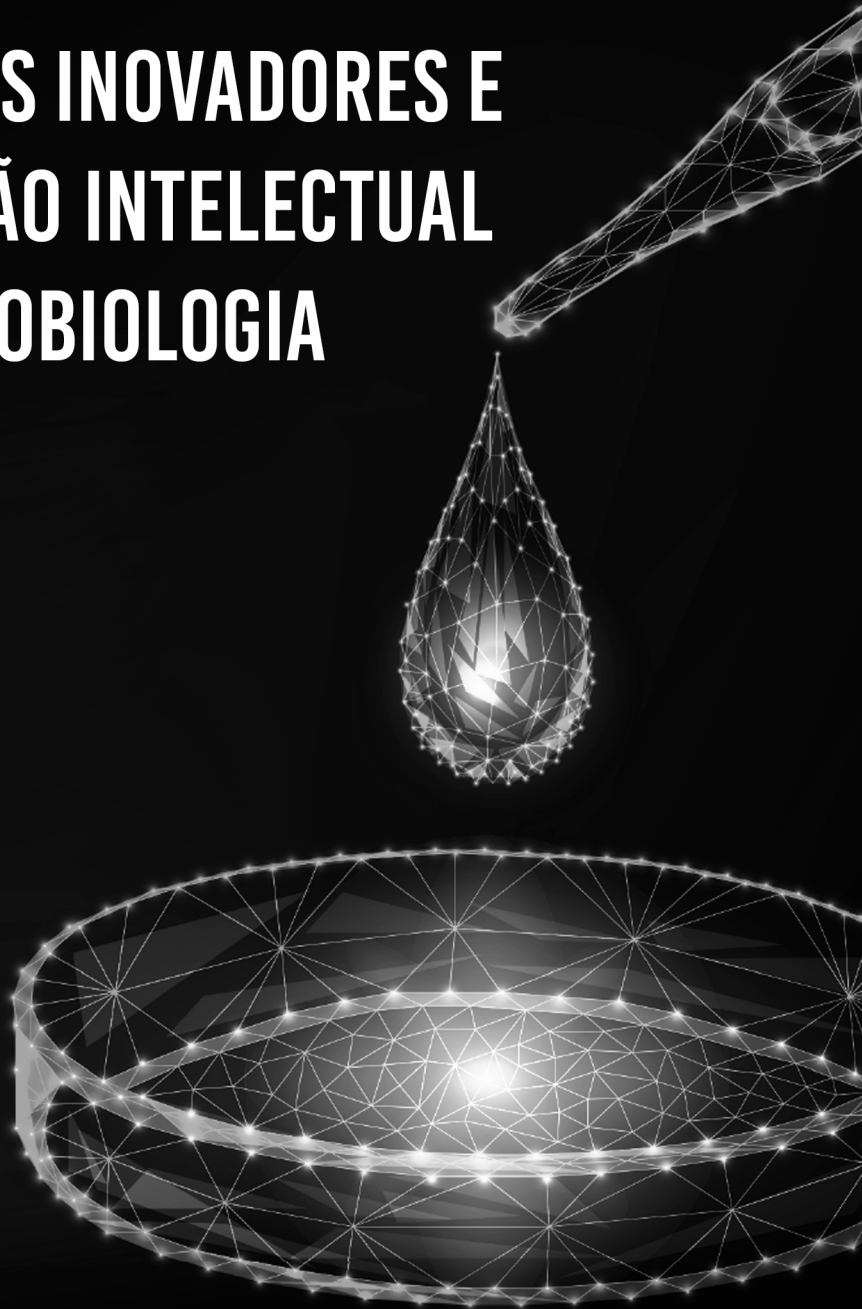
BENEDITO RODRIGUES DA SILVA NETO  
(ORGANIZADOR)

# PROJETOS INOVADORES E PRODUÇÃO INTELECTUAL NA MICROBIOLOGIA



BENEDITO RODRIGUES DA SILVA NETO  
(ORGANIZADOR)

# PROJETOS INOVADORES E PRODUÇÃO INTELECTUAL NA MICROBIOLOGIA



**Editora Chefe**

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

**Assistentes Editoriais**

Natalia Oliveira

Bruno Oliveira

Flávia Roberta Barão

**Bibliotecária**

Janaina Ramos

**Projeto Gráfico e Diagramação**

Natália Sandrini de Azevedo

Camila Alves de Cremo

Luiza Alves Batista

Maria Alice Pinheiro

**Imagens da Capa**

Shutterstock

**Edição de Arte**

Luiza Alves Batista

**Revisão**

Os Autores

2020 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do Texto © 2020 Os autores

Copyright da Edição © 2020 Atena Editora

Direitos para esta edição cedidos à Atena Editora pelos autores.



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição-Não-Comercial-NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 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.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

**Conselho Editorial**

**Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**

Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná

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. Daniel Richard Sant’Ana – Universidade de Brasília  
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia  
Profª Drª Dilma Antunes Silva – Universidade Federal de São Paulo  
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 – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice  
Prof. Dr. Jadson Correia de Oliveira – Universidade Católica do Salvador  
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  
Profª Drª Carla Cristina Bauermann Brasil – Universidade Federal de Santa Maria  
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  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Débora Luana Ribeiro Pessoa – Universidade Federal do Maranhão  
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  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira  
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> 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  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco  
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. Jefferson Thiago Souza – Universidade Estadual do Ceará  
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  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria Tatiane Gonçalves Sá – Universidade do Estado do Pará  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Natiéli Piovesan – Instituto Federaci do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá  
Prof. Dr. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Regiane Luz Carvalho – Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

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

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto  
Prof. Dr. Carlos Eduardo Sanches de Andrade – Universidade Federal de Goiás  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> 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<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Érica de Melo Azevedo – Instituto Federal do Rio de Janeiro  
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Jéssica Verger Nardeli – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho  
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> 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  
Profª Drª Priscila Tessmer Scaglioni – Universidade Federal de Pelotas  
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 Carolina Fernandes da Silva Mandaji – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
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 do Paraná  
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  
Profª Ma. Andréa Cristina Marques de Araújo – Universidade Fernando Pessoa  
Profª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico  
Profª Drª Andrezza Miguel da Silva – Faculdade da Amazônia  
Profª Ma. Anelisa Mota Gregoleti – Universidade Estadual de Maringá  
Profª Ma. Anne Karynne da Silva Barbosa – Universidade Federal do Maranhão  
Prof. Dr. Antonio Hot Pereira de Faria – Polícia Militar de Minas Gerais  
Prof. Me. Armando Dias Duarte – Universidade Federal de Pernambuco  
Profª Ma. Bianca Camargo Martins – UniCesumar  
Profª 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  
Profª Drª Cláudia Taís Siqueira Cagliari – Centro Universitário Dinâmica das Cataratas  
Prof. Me. Clécio Danilo Dias da Silva – Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Me. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará  
Profª Ma. Daniela da Silva Rodrigues – Universidade de Brasília  
Profª Ma. Daniela Remião de Macedo – Universidade de Lisboa  
Profª 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. Ernane Rosa Martins – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás  
Prof. Me. Euvaldo de Sousa Costa Junior – Prefeitura Municipal de São João do Piauí  
Profª Ma. Fabiana Coelho Couto Rocha Corrêa – Centro Universitário Estácio Juiz de Fora  
Prof. Me. Felipe da Costa Negrão – Universidade Federal do Amazonas  
Profª Drª Germana Ponce de Leon Ramírez – Centro Universitário Adventista de São Paulo  
Prof. Me. Gevair Campos – Instituto Mineiro de Agropecuária  
Prof. Me. Givanildo de Oliveira Santos – Secretaria da Educação de Goiás  
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  
Profª Ma. Isabelle Cerqueira Sousa – Universidade de Fortaleza  
Profª Ma. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia  
Prof. Me. Javier Antonio Alborno – 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. Lillian 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. Dr. 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

Profª Ma. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal

Prof. Me. Robson Lucas Soares da Silva – Universidade Federal da Paraíba

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



## Projetos inovadores e produção intelectual na microbiologia

**Editora Chefe:** Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira  
**Bibliotecária:** Janaina Ramos  
**Diagramação:** Maria Alice Pinheiro  
**Correção:** Mariane Aparecida Freitas  
**Edição de Arte:** Luiza Alves Batista  
**Revisão:** Os Autores  
**Organizador:** Benedito Rodrigues da Silva Neto

### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P964 Projetos inovadores e produção intelectual na microbiologia  
/ Organizador Benedito Rodrigues da Silva Neto. -  
Ponta Grossa - PR: Atena, 2020.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-65-5706-574-7

DOI 10.22533/at.ed.747201711

1. Microbiologia. 2. Projetos. 3. Produção. I. Silva Neto,  
Benedito Rodrigues da (Organizador). II. Título.

CDD 579

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

**Atena Editora**

Ponta Grossa – Paraná – Brasil

Telefone: +55 (42) 3323-5493

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

contato@atenaeditora.com.br

## DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos.

## APRESENTAÇÃO

A microbiologia tem sido um assunto recorrente nos últimos anos, desde os corredores universitários aos locais informais, as conversas vão desde as bactérias multirresistentes, passando por novas espécies de fungos descobertos até chegar no atual momento de pandemia viral que marcará na história o ano de 2020. Esse campo de estudo amplo inclui o estudo dos seres vivos microscópicos nos seus mais variados aspectos como morfologia, estrutura, fisiologia, reprodução, genética, taxonomia, interação com outros organismos e com o ambiente além de aplicações biotecnológicas.

Como ciência, a microbiologia iniciou a cerca de duzentos anos atrás, e tem passado por constantes avanços graças a descobertas e inovações tecnológicas. Sabemos que os microrganismos são encontrados em praticamente todos os lugares, e a falta de conhecimento que havia antes da invenção do microscópio hoje não é mais um problema no estudo, principalmente das enfermidades relacionadas aos agentes como bactérias, vírus, fungos e protozoários.

A grande importância dessa temática se reflete no material de qualidade já publicado na Atena Editora e mais uma vez recebe os nossos holofotes com o tema “Projetos Inovadores e Produção Intelectual na Microbiologia” contendo trabalhos e pesquisas desenvolvidas em diversos institutos do território nacional contendo análises de processos biológicos embasados em células microbianas ou estudos científicos na fundamentação de atividades microbianas com capacidade de interferir nos processos de saúde/doença.

Temas ligados à inovação e tecnologia microbiana são, deste modo, discutidos aqui com a proposta de fundamentar o conhecimento de acadêmicos, mestres e todos aqueles que de alguma forma se interessam pela saúde em seus aspectos microbiológicos. Deste modo, propomos aqui uma teoria bem fundamentada nos resultados práticos obtidos em diferentes campos da microbiologia, abrindo perspectivas futuras para os demais pesquisadores de outras subáreas da microbiologia.

Desejamos a todos uma excelente leitura!

Benedito Rodrigues da Silva Neto

## SUMÁRIO

### **CAPÍTULO 1..... 1**

#### **AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DOS CANAIS DO MUNICÍPIO DE SÃO VICENTE**

José Augusto de Souza  
Roberta Alves Merguizo Chinellato  
Mirella Massonetto Basilio  
Vanessa da Costa Andrade  
Ana Julia Fernandes Cardoso de Oliveira

**DOI 10.22533/at.ed.7472017111**

### **CAPÍTULO 2..... 14**

#### **AVALIAÇÃO DE CULTURA E TESTE DE SENSIBILIDADE DA TUBERCULOSE PULMONAR NO BRASIL NO ANO DE 2016**

Vinicius Mateus Salvatori Cheute  
Fabiana de Oliveira Solla Sobral  
Renan Fava Marson  
Wesley Pimenta Cândido

**DOI 10.22533/at.ed.7472017112**

### **CAPÍTULO 3..... 16**

#### **AVALIAÇÃO DE CULTURAS DE ESCARRO PARA O DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE EM 2017**

Iaci Gama Fortes  
Lysia Alves Oliva  
Bianca Melo Amorim  
Karline Drieli Wottrich

**DOI 10.22533/at.ed.7472017113**

### **CAPÍTULO 4..... 23**

#### **AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRATOS FOLIARES DE *GALLESIA INTEGRIFOLIA* (SPRENG) HARMS (PHYTOLACCACEAE)**

Julyanna Oliveira Castro  
Marcelo Schramm Mielke  
Aline Oliveira da Conceição

**DOI 10.22533/at.ed.7472017114**

### **CAPÍTULO 5..... 38**

#### **CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DOS CASOS DE DENGUE NO MUNICÍPIO DE SOBRAL-CEARA, ENTRE O PERÍODO DE 2014 A 2017**

Manoel Vieira do Nascimento Junior  
José Jackson do Nascimento Costa  
Maria Amélia Araújo Soares Costa

**DOI 10.22533/at.ed.7472017115**

**CAPÍTULO 6..... 43**

**CONTAMINATION ASSESSMENT OF BIVALVE MOLLUSK INTENDED FOR HUMAN CONSUMPTION PRODUCED IN COASTAL WATERS OF NORTHERN BRAZIL**

Daniela Cristiane da Cruz Rocha  
Aline Holanda Sousa  
Debora de Castro Costa  
Karina Lúcia Silva da Silva  
Anderson Nonato do Rosario Marinho

**DOI**

**CAPÍTULO 7..... 54**

**FATORES RELACIONADOS AS INFECÇÕES HOSPITALARES POR BACTÉRIAS: UMA REVISÃO NARRATIVA**

Érica Cristina Soares e Silva  
Antônio Rosa de Sousa Neto  
Daniella Farias Almeida  
Mayara Macêdo Melo  
Marly Marques Rêgo Neta  
Rosângela Nunes Almeida  
Inara Viviane de Oliveira Sena  
Daniela Reis Joaquim Freitas

**DOI**

**CAPÍTULO 8..... 65**

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS VISANDO ESTUDOS DE AMILASES E PECTINASES COM APLICAÇÃO EM PROCESSOS INDUSTRIAIS**

Daniel Borba Zanelatto  
Mariana Cereia  
Tássio Brito de Oliveira  
Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli

**DOI**

**CAPÍTULO 9..... 78**

**INDUSTRIAL YEAST STRAINS RESISTANCE TO NATURAL BIOACTIVE COMPOUNDS**

Patrícia Regina Kitaka  
Marta Cristina Teixeira Duarte  
Valéria Maia de Oliveira  
Maria da Graça S. Andrietta

**DOI**

**CAPÍTULO 10..... 95**

**INVESTIGAÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE ENZIMAS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO**

Layne Even Borges de Souza  
Leidiana Pinto da Costa  
Rafael Cardoso Bastos  
Thayana Cruz de Souza

**DOI**

**CAPÍTULO 11..... 109**

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE QUITINASE PELO FUNGO ENDOFÍTICO *CURVULARIA* SP. URM 6861**

Aline Gleyce Julião Bomfim  
Edson Flávio Teixeira da Silva  
Wellington Leal dos Santos  
Maria Emília Brito da Silva  
Cristina Maria de Souza-Motta  
Keila Aparecida Moreira

**DOI 10.22533/at.ed.74720171111**

**CAPÍTULO 12..... 118**

**PARTIÇÃO DE PROTEASES FIBRINOLÍTICAS PRODUZIDAS POR *ASPERGILLUS TAMARII* KITA UCP 1279 ATRAVÉS DO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS PEG-FOSFATO**

Viviane do Nascimento e Silva Alencar  
Maria Clara do Nascimento  
Julyanne Victória dos Santos Ferreira  
Márcia Nieves Carneiro da Cunha  
Juanize Matias da Silva Batista  
Thiago Pajeú Nascimento  
Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa  
Ana Lucia Figueiredo Porto  
Ana Cristina Lima Leite

**DOI 10.22533/at.ed.74720171112**

**CAPÍTULO 13..... 130**

**PRODUÇÃO DE PROTEASES POR *ASPERGILLUS TAMARII* KITA UCP 1279 ISOLADO DA CAATINGA UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Julyanne Victória dos Santos Ferreira  
Kethylen Bárbara Barbosa Cardoso  
Amanda Lucena dos Santos  
Viviane do Nascimento e Silva Alencar  
Maria Clara do Nascimento  
Marcia Nieves Carneiro da Cunha  
Juanize Matias da Silva Batista  
Romero Pedrosa Brandão Costa  
Thiago Pajeú Nascimento  
Ana Cristina Lima Leite  
Ana Lúcia Figueiredo Porto

**DOI 10.22533/at.ed.74720171113**

**CAPÍTULO 14..... 140**

**PRODUCTION OF YEAST BIOMASS AND CELL WALL TO OBTAIN  $\beta$  GLUCANS FOR A BIOTECHNOLOGICAL PURPOSE**

Carina Maricel Pereyra

**DOI 10.22533/at.ed.74720171114**

<b>CAPÍTULO 15.....</b>	<b>157</b>
<b>REMOÇÃO DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO EMPREGANDO BIOFILME MICROBIANO DESENVOLVIDO NATURALMENTE EM AREIA DE FILTROS DE ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ÁGUA – UM ESTUDO COMPARATIVO COM DIFERENTES SUPORTES</b>	
Lúcia Allebrandt da Silva Ries	
Karla Joseane Perez	
Fernanda Cortez Lopes	
Paula Silva Pereira	
<b>DOI 10.22533/at.ed.74720171115</b>	
<b>CAPÍTULO 16.....</b>	<b>176</b>
<b>TUBERCULOSE: ASPECTOS DA INFECÇÃO CAUSADA POR <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> NA POPULAÇÃO DE SOBRAL, NO ESTADO DO CEARÁ NO PERÍODO DE 2012-2016</b>	
Sabrina Fuziger Inácio Brandão	
Anderson Braga Rodrigues	
Karla Karoline Frota da Silva	
Isana Mara Aragão Frota	
<b>DOI 10.22533/at.ed.74720171116</b>	
<b>SOBRE O ORGANIZADOR.....</b>	<b>182</b>
<b>ÍNDICE REMISSIVO.....</b>	<b>183</b>

# CAPÍTULO 1

## AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DOS CÂNAIS DO MUNICÍPIO DE SÃO VICENTE

Data de aceite: 01/10/2020

Data de submissão: 05/08/020

### **José Augusto de Souza**

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Biociências -  
Campus de Rio Claro – UNESP IB-RC  
Rio Claro – SP

CV: <http://lattes.cnpq.br/1494154444946096>

### **Roberta Alves Merguizo Chinellato**

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Biociências -  
Campus do Litoral Paulista – UNESP IB-CLP  
São Vicente – SP

CV: <http://lattes.cnpq.br/3745766498493621>

### **Mirella Massonetto Basilio**

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Biociências -  
Campus de Rio Claro – UNESP IB-RC  
Rio Claro – SP

CV: <http://lattes.cnpq.br/2425344240253550>

### **Vanessa da Costa Andrade**

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Biociências -  
Campus de Rio Claro – UNESP IB-RC  
Rio Claro – SP

CV: <http://lattes.cnpq.br/5127402794012015>

### **Ana Julia Fernandes Cardoso de Oliveira**

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Biociências -  
Campus do Litoral Paulista – UNESP IB-CLP  
São Vicente – SP

CV: <http://lattes.cnpq.br/5943302892908770>

**RESUMO:** A ocupação desordenada das áreas dos diques no município de São Vicente (Estado de São Paulo – Brasil) acarreta no descarte indevido de efluentes diretamente nos canais, sem tratamento prévio, o que proporciona contaminação desses e de outros corpos d’água adjacentes, principalmente em épocas de chuvas ou eventos de ressaca do mar. Alguns patógenos são comumente encontrados em locais contaminados por efluentes, especialmente domésticos, tais eles como a *Escherichia coli* e bactérias do gênero *Enterococcus*, sendo um grave problema de saúde pública. Estes microrganismos podem ocasionar gastroenterites, eventos diarreicos entre vários outros sintomas, que pode ocorrer por contato direto ou indireto com a água dos canais. Desta forma, a presença destes microrganismos serve como indicadores de balneabilidade e qualidade ambiental, indicando a contaminação dos canais. O presente trabalho teve por objetivo verificar e monitorar a qualidade das águas dos canais da porção insular do município de São Vicente, de forma qualitativa, durante um período de 06 meses. A presente área de estudo possui um grande número de residências e palafitas, sendo inexistente a coleta e tratamento de esgoto. Para a avaliação, foi utilizado o protocolo de balneabilidade da CETESB, que é embasado na resolução CONAMA 357 para águas salobras. Já para determinar a balneabilidade das águas foram analisados os parâmetros microbiológicos (*E. coli* e *Enterococcus* spp) e ambientais (temperatura, salinidade, pH, oxigênio dissolvido e turbidez). Os dados analisados mostraram que a balneabilidade está seriamente comprometida



em todos os pontos durante todo o monitoramento da área, apresentando praticamente em todos os pontos, valores incontáveis de Unidades de Formação de Colônias (algumas placas foram contadas para referência: *E. coli* 232400 UFC/100 ml e *Enterococcus* spp. 51200 UFC/100 ml). Em relação aos parâmetros ambientais apresentaram alterações em relação aos valores de referências de oxigênio dissolvido (OD) e salinidade devido aos efluentes domésticos e a quantidade de microrganismos presentes na água. Com isso, é extremamente necessária a ação de políticas públicas de saneamento para as áreas em questão a fim de diminuir a contaminação que acaba se espalhando por todo o complexo estuarino da região.

**PALAVRAS - CHAVE:** Contaminação microbiana, esgoto, drenagem urbana

## EVALUATION OF MICROBIAL QUALITY FROM WATER CHANNELS OF SÃO VICENTE MUNICIPALITY (SP)

**ABSTRACT:** The disordered occupation of dike areas in São Vicente municipality (São Paulo State, Brazil) leads to the improper discharge of effluents, without any previous treatment. The discharge of sewage results in contamination of adjacent water bodies, specially when it is rain season or storm surge. Some pathogens (*e.g. Escherichia coli* and *Enterococcus* spp.) are commonly detected on areas contaminated by effluents, specially sewage, being a serious risk to public health. These microorganisms may cause gastroenteritis, diarrheal events among other symptoms, which may occur through direct or indirect contact with the water of the canals. Thus, the bacteria present serve as indicators of balneability and environmental quality, indicating a contamination of the channels. This study aimed to verify and monitor the water quality of the water channels from insular area from São Vicente, during six months. The study area had a large number of residences and stilts houses, with no collection and treatment of sewage. For the evaluation, the bathing protocol of CETESB was used, which is based on the resolution CONAMA 357/2005 for brackish waters. The microbiological parameters (*E. coli* and *Enterococcus* spp.) and environmental parameters (temperature, salinity, pH, dissolved oxygen and turbidity) were analyzed to determine the water balneability. The data analyzed showed that the balneability is seriously compromised at all sampling points. At almost all samples presented countless values for both studied microorganisms (reference for countless samples: *E. coli*  $\geq 232400$  CFU  $100\text{mL}^{-1}$  and *Enterococcus* spp.  $\geq 51200$  CFU  $100\text{mL}^{-1}$ ). Regarding the environmental parameters, there were alterations in the reference values of dissolved oxygen (DO) and salinity due to domestic present in the water. Thereby, it is extremely necessary to implement public sanitation policies for this area, in order to reduce the contamination that is spreading throughout the entire estuarine complex of São Vicente.

**KEYWORDS:** Microbial contamination, sewage, urban drainage.

## 1 | INTRODUÇÃO

O crescimento populacional nos municípios de regiões costeiras levou a uma série de obras para a ampliação da área urbana habitável em diversas cidades o que acabou acarretando em diversas ocupações desordenadas levando a favelização de diversas áreas, dentre elas, o município de São Vicente (Estado de São Paulo – Brasil) na década de 50 iniciou a construção de diques para conter enchentes causadas pela maré e assim expandir

a área urbana. Essas favelas construídas nos diques, eu sua grande maioria composta por palafitas (barracos de madeira suspensos construídos diretamente sobre água ou lama), não requerem de sistema de coleta de esgoto ou qualquer tipo de tratamento dos efluentes gerados que são lançados diretamente nos canais (Figura 1). (Tadeu, 2005; Castanheira et. al. 2007; Siqueira, 2007; Fabiano e Muniz, 2010; Mello, 2013, Relatório – 4, 2018; Instituto Pólis, 2013)

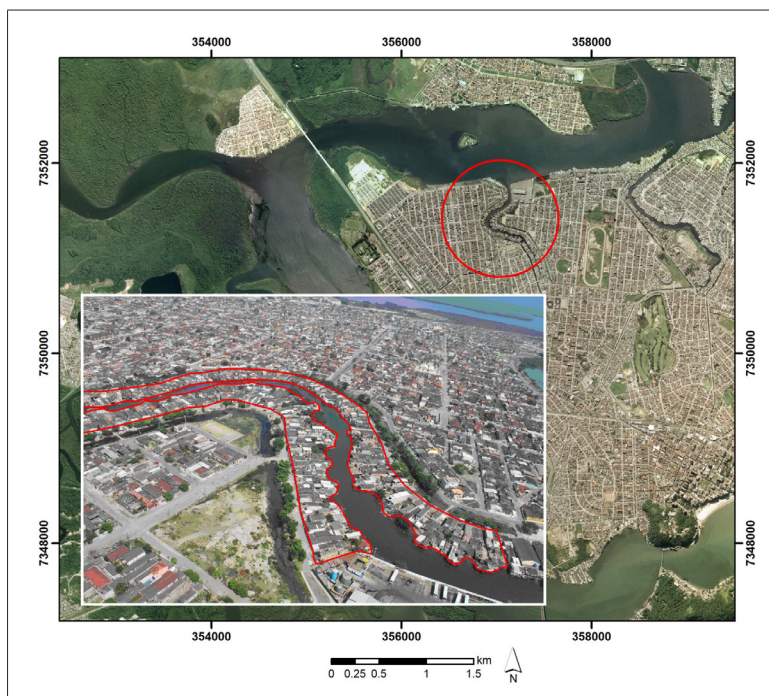


Figura 1 – Ilha o Vicente (Ortofoto do ano de 2001). Detalhe para palafitas associadas aos canais do Dique do Caxetas (esquerda), Dique do Pompeba/Piçarro (direita) e Rio Caxetas ao meio

(Foto: TOPPA, R.H.; BUCHMAN, F.S., 2008). Fonte: Mello, 2013

O despejo de efluentes deve seguir uma serie de parâmetros para que haja segurança tanto para humanos quanto ao meio ambiente sendo regulamentada pela Resolução CONAMA 430 que dispõe sobre condições, parâmetros, padrões e diretrizes para gestão do lançamento de efluentes em corpos de água receptores, e uma vez que não seja seguido, pode levar a contaminação dos corpos receptores podendo acarretar na disseminação de doença de veiculação hídrica e outros, principalmente em épocas que ocorrem alagamentos devido a chuvas ou eventos de ressaca do mar. (Giatti et al., 2004;

Oliveira, 2017; Sampaio, 2010; Stradiotto, 2013; instituto Pólis, 2013)

Diversos organismos patogênicos podem ser comumente encontrados em locais contaminados por efluentes, especialmente domésticos, tais como helmintos, protozoários, fungos, vírus, bactérias, entre outros, formando um grave problema de saúde pública. Dentre as bactérias, a *Escherichia coli* e as bactérias do gênero *Enterococcus* podem ocasionar gastroenterites, eventos diarreicos, vômitos e náuseas, entre vários outros sintomas, que pode ocorrer por contato direto ou indireto, consumo de água e alimentos contaminados com microrganismos presentes nos canais (Figura 2). (Giatti et al., 2004; Oliveira, 2017; Stradiotto, 2013; John e Carvalho, 2011)



Figura 2 – Jovens nadando próximos a palafitas no Dique do Caxetas.

Fonte: José Augusto de Souza.

Além disso, a presença destes microrganismos pode servir como bioindicadores de qualidade de água, que pode ser classificada de acordo com o tipo de contato pela Resolução CONAMA 357 que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, que é controlada pela CETESB utilizando protocolo de balneabilidade para o contato direto com essas águas.

## 2 | METODOLOGIA

A área de estudo se situa na área insular do município de São Vicente, litoral do Estado de São Paulo. As coletas foram realizadas mensalmente, durante o período de maré baixa diurna, por um período de seis meses, para uma avaliação temporal dos canais. Ao todo foram coletadas 72 amostras neste período que compreenderam os meses de junho

a novembro de 2018. As coletas foram realizadas nos canais de drenagem dos diques do município (Figura 3).

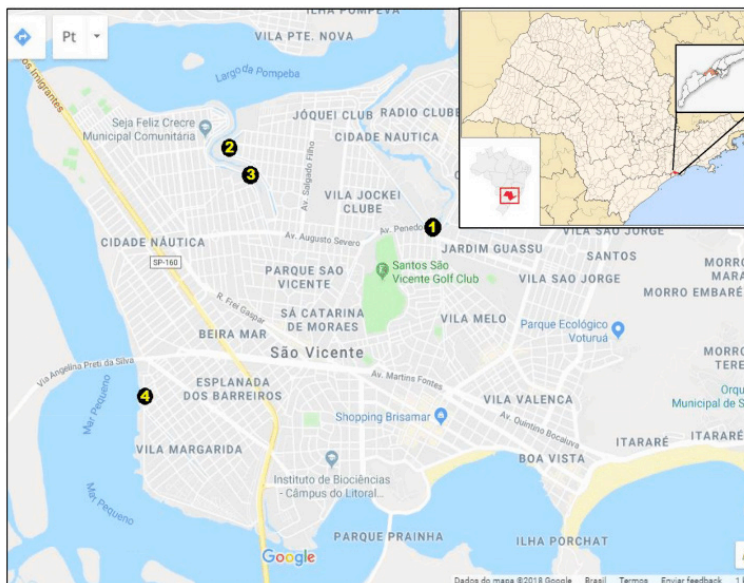


Figura 3 - Localização dos canais dos Diques na área insular do Município de São Vicente – SP.

(Fonte: Google Maps adaptado por José Augusto de Souza.).

As coletas foram realizadas em quatro diferentes canais do município (Tabela 1), em três diferentes pontos em cada canal, uma na entrada do canal (comporta), uma na saída do canal (após a comporta dentro do rio/estuário) e outra na ao longo do canal de cada dique.

LOCAL	NOME DO DIQUE	BAIRRO	COORDENADAS GPS
Canal 1	Sambaiatuba	Jóquei Clube	(23°56'58.95"S 46°23'07.82"O)
Canal 2	Caxetas	Jóquei Clube	(23°56'36.57"S 46°24'19.36"O)
Canal 3	Piçarro/Pompeba	Cidade Náutica	(23°56'43.55"S 46°24'11.66"O)
Canal 4	México 70	Vila Margarina	(23°57'49.85"S 46°24'48.61"O)

Tabela 1 – Localização dos Diques

Fonte: Elaborado por José Augusto de Souza.

Amostras de água foram coletadas em frascos estéreis e mantidas sob-refrigeração em caixa térmica (cooler) com bolsas de gelo artificial reutilizável e encaminhadas para análise no Laboratório de Microbiologia Marinha (MICROMAR) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Instituto de Biociências Campus do Litoral Paulista – IB-CLP São Vicente, iniciando-se o processamento das amostras imediatamente após a chegada.

## 2.1 Densidades

As densidades foram analisadas através da técnica de membrana filtrante (APHA, 2012), utilizando membrana celulósica com  $0,45\mu\text{m}$  de porosidade, e após a filtragem, as membranas foram depositadas em placas contendo meio de cultura ágar mTEC para *E. coli* e ágar mENTEROCOCCUS para *Enterococcus* spp. e processadas (*E. coli* – incubação em estufa a  $35\pm 2^\circ\text{C}$  por 2 h e em seguida a  $44^\circ\text{C}$  em banho-maria por 24h; *Enterococcus* spp. – incubação em estufa bacteriológica  $35\pm 2^\circ\text{C}$  por 48h). Após a incubação as colônias foram contadas e suas densidades expressas em Unidades Formadoras de Colônias por 100mL (UFC  $100\text{mL}^{-1}$ ). (Figura 4)

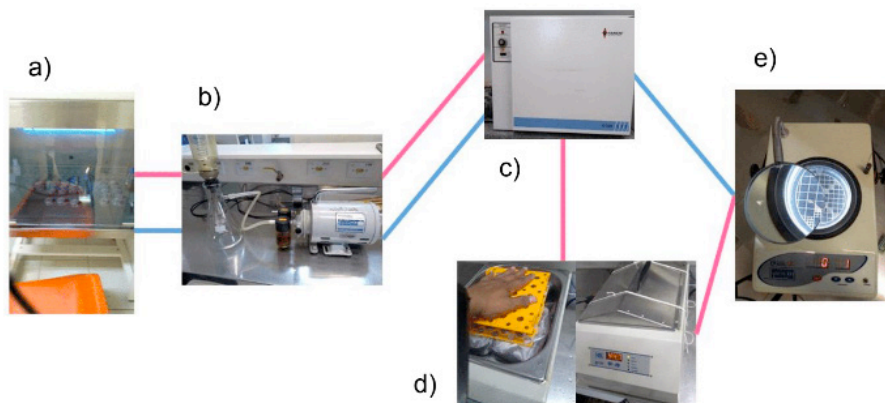


Figura 4 – Passo a passo da análise das amostras. a) preparação das placas; b) Filtragem; c) estufa bacteriológica; d) Banho-maria; e) Contagem de UFC. Linha rosa representando *E. coli* (gram negativa) e linha azul representando *Enterococcus* spp. (gram positiva).

Fonte: José Augusto de Souza.

O teste confirmatório para *E. coli* foi realizado utilizando solução de ureia (com vermelho de fenol) a 2% (1,0 mg / 100 mL) pH 7,2, sobre papel filtro absorvente pelo período de 20 minutos. Colônias que mantiveram a cor amarelada ou mudaram de cor para amarelo-marrom foram consideradas positivas. Já para confirmação de *Enterococcus* spp., colônias de coloração vermelho-marrom foram escolhidas de forma aleatória nas placas e inoculadas em tubo de ensaio contendo o meio Enterococcosel Caldo (Becton Dickinson Laboratories), e processadas como recomenda o manual (incubação em estufa

bacteriológica a 37°C pelo período de 2-4h a 18-24h). Os tubos onde os meios de cultura enegreceram foram considerados positivos.

### 3 | RESULTADOS

O resultado das densidades encontradas ao analisar as amostras foram extremamente altas, como mostra o gráfico 1, e devido a isso, as frações da filtragem acima de 5 ml foram desconsideradas, pois eram impossíveis de ser calculadas ou estimadas, ficando apenas frações de 1 ml e 5 ml a serem analisadas.

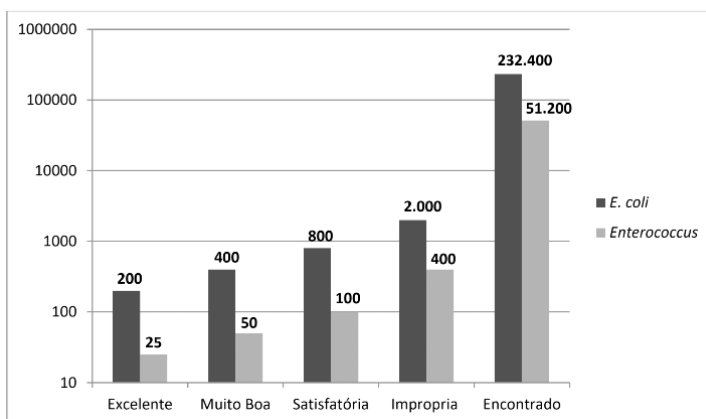


Gráfico 1 – Balneabilidade x Densidade encontrada (escala Logarítmica).

Fonte: Elaborado por José Augusto de Souza.

Os resultados das densidades obtidos tanto para *E. coli* quanto para *Enterococcus* spp. se mostraram maiores do que os esperados e isso se deve às áreas de coleta não possuírem sistema de coleta de esgoto, muito menos tratamento, e os efluentes domésticos são lançados diretamente nos canais como mostra o Resumo Executivo de São Vicente. Além disso, o resultado obtido também se deve a outros fatores observados como densidade demográfica da região em questão e o fluxo de água.

O alto adensamento populacional nessas áreas, que diferentemente do encontrado por Borges (2002), Cunha (2010), Giatti (2004) e Lopez e Magalhães Jr (2010), onde a baixa quantidade de moradias e a distância entre elas obtiveram densidades microbianas menores que as encontradas e os diques podem ultrapassar 10.000 hab./km<sup>2</sup>.

O fluxo de água nos canais sofre incidência direta da maré, se enchendo com a as águas salobras a salinas do estuário com o período de enchente, podendo ser diluída até águas consideradas doces devido à quantidade massiva de efluentes domésticos durante

o período vazante da maré (que dura em torno de 6 horas), diferentemente dos rios, pois possuem um fluxo unidirecional como visto em Borges (2002); Cunha (2010) e Vasconcelos (2006) uma menor densidade microbiana, pois o fluxo de água carreava e diluía o efluente.

### 3.1 Fatores Abióticos

Os resultados obtidos (Tabela 2) se mantiveram estáveis para o pH em todo o período de amostragem, entretanto a salinidade variou de 0,3 mínimo (água doce) chegando a 31 máxima (água salina) sendo classificadas como água doce e salgada respectivamente, se mantendo classificada como água salobra na maior parte do tempo. Essa variação pode ser explicada pelo aporte de água salina / salobra durante a enchente da maré e o aporte de água doce dos efluentes.

O O.D. também variou bastante tendo mínima de 0,62 mgL<sup>-1</sup> e máxima de 8,33 mgL<sup>-1</sup> durante a amostragem. As mínimas podem ser explicadas pelo metabolismo microbiano e o consumo de matéria orgânica dissolvida e as máximas foram encontradas nas áreas com maior velocidade de correnteza devido à morfologia dos canais.

	<b>D. O. (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Salinity</b>	<b>pH</b>
S1	2.24	1.52	6.98
S2	3.26	1.68	7.04
S3	1.91	2.68	6.81
C1	1.00	11.47	7.08
C2	2.50	11.10	7.17
C3	1.47	12.87	6.91
P1	3.29	4.52	6.87
P2	2.47	5.72	7.02
P3	1.11	3.15	6.79
M1	3.13	10.65	7.14
M2	4.48	18.10	7.17
M3	2.53	10.13	7.18

Tabela 2 – Média dos parâmetros físico-químicos.

Fonte: Elaborado por José Augusto de Souza.

### 3.2 *Escherichia coli*

As densidades encontradas nas amostras se mostraram em quase sua totalidade acima dos limites, sendo consideradas incontáveis por apresentarem densidades superior a 300 UFC/100ml nas placas com frações de 1 ml e 5 ml. Das 72 amostras a exceção ocorreu apenas no ponto M2 durante a 4ª coleta, que ocorreu uma enchente da maré antes do previsto, com a água oriunda do estuário, e a amostra obteve valores de 1900 UFC/100

ml e 700 UFC/100 ml nas filtragens de 1 ml e 5 ml respectivamente, porém, mesmo apresentando valores inferiores a densidades encontradas na maioria das amostras ainda estavam acima da densidade estipulada que caracteriza águas impróprias de acordo com a Resolução CONAMA 274 e a balneabilidade continuaria comprometida.

Para efeito de padrão, algumas placas foram contadas para que pudesse ser estipulado que realmente se enquadrariam como incontáveis e o valor contabilizando na placa de 1 ml foi 2.324 UFC (Figura 5).

O despejo de efluentes sem tratamento nos canais influencia diretamente todo o complexo do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente, incluindo rios e praias, o que pode ser corroborado por da Costa Andrade (2015) onde foram encontradas maiores densidades de *E. coli* nas águas e areias da praia da do Gonzaguinha, mais próxima à saída do estuário, do que encontradas na praia da Ilha Porchat (mais afastada da saída do estuário).

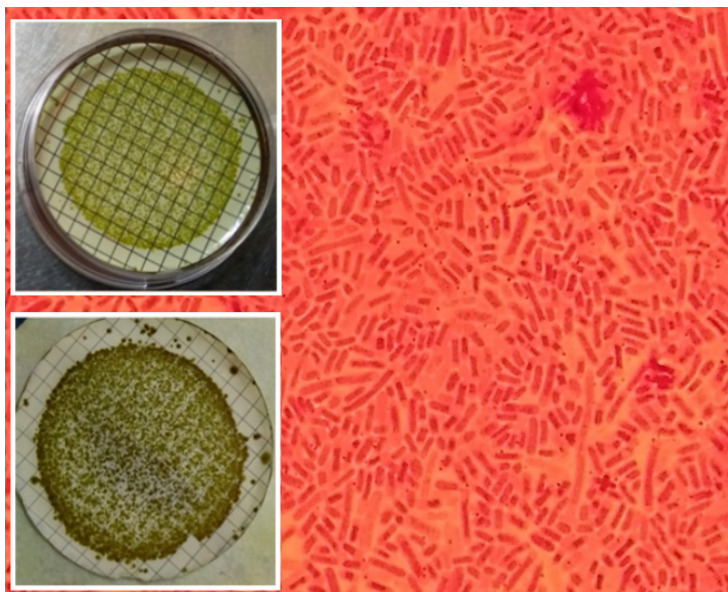


Figura 5 – Morfologia de *E. coli* (macro morfologia superior esquerda - UFC); Micro morfologia (Central); Teste confirmatório com solução de ureia (inferior esquerda).

Fonte: José Augusto de Souza.

### 3.3 *Enterococcus* spp

Em 100 % das 72 amostras, as densidades de *Enterococcus* (Figura 6) foram superiores aos níveis estabelecidos na Resolução CONAMA 274 (chegando a 51.200 UFC/100 ml) o que corrobora com o encontrado por Pinto, 2012, onde as maiores



densidades de *Enterococcus* spp. foram encontradas na Praia da Biquinha São Vicente/ SP, quando comparadas a Praia do Itararé – São Vicente/SP, por sua localização mais próxima a saída do Estuário.

Devido ao fluxo vazante do estuário, as águas ao saírem dos canais, se acumulam no estuário e são dispersas próximas a Praia da Biquinha e também durante a subsequente enchente da maré. (John e Carvalho, 2011, Resumo 4, 2018).

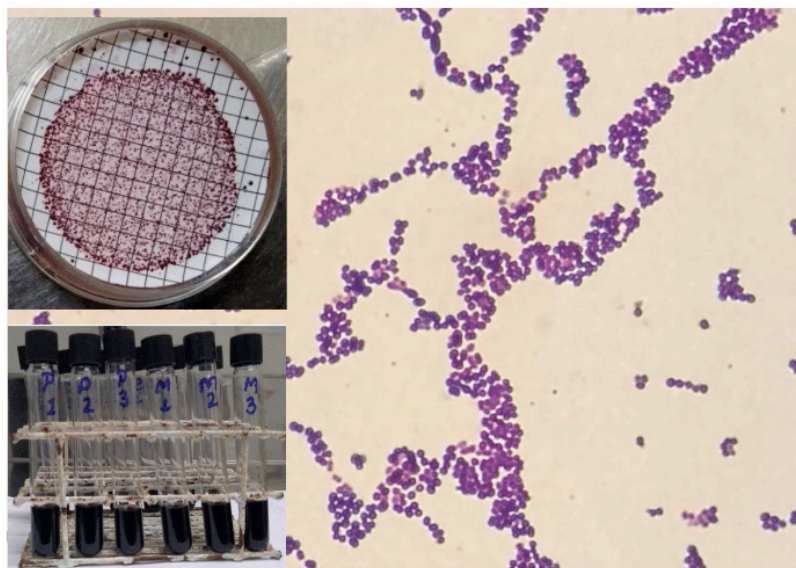


Figura 6 – Morfologia de *Enterococcus* spp. (macro morfologia superior esquerda - UFC); Micro morfologia (Central); Teste confirmatório em Enterococcosel Caldo (inferior esquerda).

Fonte: José Augusto de Souza.

### 3.4 Balneabilidade

Nenhum dos pontos analisados, durante todo o período de coleta, puderam ser considerados próprios para o contato direto de acordo com os critérios de balneabilidade da Resolução CONAMA 274 utilizados (Tabela 3).

Devido à variação maré, ressacas do mar ou fortes chuvas, alagamentos podem ocorrer e elevar o risco de contato da população com a contaminação microbológica das águas dos canais. Com isso, não só a balneabilidade dos canais devem ser levadas em consideração, mas também de todo o sistema estuarino e das praias da região, pois essa contaminação causada pelos efluentes sem tratamento pode acarretar em um problema de saúde pública e ambiental generalizado, com surtos de doenças de veiculação hídrica como gastroenterites, colites, cólera, hepatite, entre diversas outras com sintomas similares

e eventos diarreicos que podem acentuar ainda mais o problema causado pela falta de tratamento por todo o município e região. (Pólis, 2013; Resumo 4, 2018).

Pontos	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4	Coleta 5	Coleta 6
	jun/18	jul/18	ago/18	set/18	out/18	nov/18
S1	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA
S2	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA
S3	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA
C1	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA
C2	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA
C3	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA
P1	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA
P2	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA
P3	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA
M1	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA
M2	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA
M3	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA	IMPRÓPRIA

Tabela 3 - Balneabilidade dos canais de acordo com os parâmetros vigentes na CONAMA e fiscalizados pela CETESB

Fonte: Elaborado por José Augusto de Souza.

## 4 I CONCLUSÃO

As densidades microbiológicas encontradas indicam alto índice de contaminação de origem fecal nos canais dos diques do município de São Vicente, oriunda dos efluentes domésticos lançados sem qualquer tipo de tratamento nos canais, e com a variação de maré (enchentes e vazantes que ocorrem duas vezes ao dia), essa contaminação é levada para os rios, estuário e praias, influenciando fortemente a balneabilidade de todo o Sistema Estuarino de Santos e São Vicente, que é usado como forma de recreação pela população (residentes e turistas), fonte de recurso alimentar (subsistência e comércio), entre outros, e que também, por eventos naturais como chuvas e ressacas do mar, alagam levando a contaminação ao contato com a população, geralmente a mais carente.

Dessa forma, é extremamente necessário à implementação de rede coletora de esgotos nessas áreas e que a balneabilidade desses canais seja incorporada pela CETESB para que haja maior controle sobre o lançamento de efluentes, o que irá gerar impacto significativo na saúde pública do município, na qualidade ambiental e paisagística, no turismo e com isso na receita municipal.

## REFERÊNCIAS

APHA, American Public Health Association. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. APHA, AWWA, WEF. 22th Edition. 2012.

Borges, K. P.; Bertolin, A.O. **Avaliação microbiológica da qualidade da água do córrego são João, Porto Nacional – TO, Brasil**. Holos Environment, v.2 n.2 – P.174-184, 2002.

Brasil. **Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução n. 274**, de novembro de 2000.

Brasil. **Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução n. 357**, de março de 2005.

Brasil. **Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução n. 430**, de maio de 2011.

CASTANHEIRA, S.A. et al. **Percepção sócio-ambiental da comunidade do Dique do Sambaiatuba, em São Vicente (SP)**. 2º Congresso Internacional de Tecnologia para o Meio Ambiente – 2010.

Cunha, A. H. et. al. **Análise microbiológica da água do rio Itanhém em Teixeira de Freitas-BA**. REVISTA BIOCÊNCIAS, UNITAU. Volume 16, número 2, 2010.

da Costa Andrade, V., Del Busso Zampieri, B., Ballesteros, E.R. et al. **Densities and antimicrobial resistance of Escherichia coli isolated from marine waters and beach sands**. Environ Monit Assess 187, 342 (2015). <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4573-8>

FABIANO, C.; MUNIZ, S. **Dique Vila Gilda : Caminhos Para a Regularização**. Preservation, p. 231–240, 2010.

GIATTI, L. L. et al. **Condições de saneamento básico em Iporanga, Estado de São Paulo**. Revista de Saude Publica, v. 38, n. 4, p. 571–577, 2004.

Instituto Pólis. **Resumo Executivo de São Vicente. Litoral Sustentável – Desenvolvimento com Inclusão Social**. Instituto Pólis - 2013.

JOHN, U. V.; CARVALHO, J. **Enterococcus: Review of its physiology, pathogenesis, diseases and the challenges it poses for clinical microbiology**. Frontiers in Biology, v. 6, n. 5, p. 357–366, 2011.

LOPES, F. W. A.; MAGALHÃES JR, A. P. **Avaliação Da Qualidade Das Águas Para Recreação De Contato Primário Na Bacia Do Alto Rio Das Velhas, Mg. Hygeia: Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 6, n. 11, 2010.

OLIVEIRA, R. S. **Densidade e diversidade de fenótipos de resistência a antimicrobianos de Enterococcus sp, Escherichia coli e Aeromonas sp isoladas de água, sedimento e mexilhão coletados em Santos e Itanhaém, São Paulo, Brasil**. 62p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Campus do Litoral Paulista - Instituto de Biociências São Vicente 2017.

PINTO, A. B.; PEREIRA, C.R.; OLIVEIRA, A.J.F.C. **Densidade de Enterococcus sp. Em águas recreacionais e areias de praias do município de São Vicente-SP, Brasil e sua relação com parâmetros abióticos**. O Mundo da Saúde (Impresso), v.36, p587 – 593, 2012.

SAMPAIO, A. F. P. **Avaliação da correlação entre parâmetros de qualidade da água e socioeconômicos no complexo estuarino de Santos - São Vicente, através de modelagem numérica ambiental.** Dissertação p.171, 2010.

SIQUEIRA, M. E. S. A. **TURISMO E FAVELAS – Necessidades e Possibilidades: o caso da urbanização da Favela do Dique Sambaiaatuba, em São Vicente (Baixada Santista - São Paulo)** 250p. Dissertação (Doutorado) Universidade de São Paulo, 2007

STRADIOTTO, G. C. **Densidade e resistência a antimicrobianos de Enterococcus sp e Escherichia coli isoladas de águas , areias e algas do gênero Sargassum de praias recreacionais do Litoral Norte do Estado de São Paulo.** 96p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro. 2013

Relatório 4. **PLANO MUNICIPAL INTEGRADO DE SANEAMENTO BÁSICO.** Município de São Vicente, Revisão 2018.

TADEU, J. et al. **Percepção sócio-ambiental da comunidade do Dique do Sambaiaatuba , em São Vicente ( SP ).** p. 1–8, 2005.

Vasconcellos F.C. da S.; et al. **Qualidade microbiológica da água do rio são lourenço, são lourenço do sul, rio grande do sul.** Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.73, n.2, p.177-181, abr./jun., 2006

# CAPÍTULO 2

## AVALIAÇÃO DE CULTURA E TESTE DE SENSIBILIDADE DA TUBERCULOSE PULMONAR NO BRASIL NO ANO DE 2016

Data de aceite: 01/10/2020

Data de submissão: 06/10/2020

### Vinicius Mateus Salvatori Cheute

Universidade Estadual de Maringá – UEM  
Maringá - Paraná  
<http://lattes.cnpq.br/9933543841955587>

### Fabiana de Oliveira Solla Sobral

Sem Instituição (Atualmente)  
Ji-Paraná – Rondônia  
<http://lattes.cnpq.br/3221147942311237>

### Renan Fava Marson

Instituição de Ensino Superior de Cacoal –  
FANORTE  
Cacoal – Rondônia  
<http://lattes.cnpq.br/0385845697276301>

### Wesley Pimenta Cândido

Centro Universitário São Lucas Ji-Paraná  
Ji-Paraná – Rondônia  
<http://lattes.cnpq.br/3485940293168309>

**RESUMO:** A Tuberculose Pulmonar é uma doença infectocontagiosa, presente no cenário epidemiológico do Brasil. Dentre os métodos de diagnóstico, a cultura permite identificar o bacilo como o *Mycobacterium tuberculosis*, além de testar sua sensibilidade aos quimioterápicos. O objetivo deste trabalho é avaliar a realização de cultura e Teste de Sensibilidade (TS) entre os casos novos de Tuberculose Pulmonar no Brasil, no ano de 2016. Trata-se de um estudo de caráter observacional, retrospectivo, e quantitativo,

em que os dados foram coletados da ficha de notificação de Tuberculose do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Ao longo do ano estudado, foram notificados 60.507 casos novos de Tuberculose Pulmonar no Brasil. Entre os casos identificados com os sintomas da doença, em apenas 30,3% dos casos (n=18.348) houve a realização de cultura do material secretado (escarro). Foram positivas, em 72,9% dos casos (n=13.368). A partir dessas amostras com positividade, em 44,5% delas realizaram-se o TS, para identificar se o microrganismo causador da Tuberculose no indivíduo é resistente ou sensível aos antimicrobianos existentes, disponíveis para tratamento. Em 92,6% dos casos (n=5.522) os microrganismos foram sensíveis às drogas, já em 7,4% dos casos (n=442) apresentaram resistência a elas. Observou-se um alto índice de negligência em relação aos pacientes com Tuberculose Pulmonar, afinal em 69,7% dos casos não houve diagnóstico laboratorial, que pudesse identificar o patógeno causador da Tuberculose no paciente. E, de todos que realizaram a cultura, em 72,9% foram positivas, o que demonstra um fator de risco real para a população, já que o número se encontra acima dos padrões aceitáveis para a doença. A partir destes dados, pode-se observar que há um número elevado de casos de Tuberculose Pulmonar sem diagnóstico laboratorial. Isso dificulta o tratamento, piora o quadro da doença no país, e impede que se tenha a situação clínica atual da Tuberculose no Brasil.

**PALAVRAS - CHAVE:** Diagnóstico; *Mycobacterium tuberculosis*; Sensibilidade.

## CULTURE EVALUATION AND SENSIBILITY TEST OF PULMONARY TUBERCULOSIS IN BRAZIL IN 2016

**ABSTRACT:** Pulmonary Tuberculosis is an infectious disease, present in the epidemiological scenario of Brazil. Among the diagnostic methods, culture allows the identification of the bacillus as *Mycobacterium tuberculosis*, in addition to testing its sensitivity to chemotherapeutic agents.

**KEYWORDS:** Diagnosis; *Mycobacterium tuberculosis*; Sensibility

### REFERÊNCIAS

Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Sistema de informação de agravos de notificação – Sinan: normas e rotinas [Internet]. **Programa Nacional de Controle da Tuberculose:** Ministério da Saúde; 2018 [citado 2018 mai 15]. 60 p. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/19/APRES-PADRAO-JAN-2018-REDUZIDA.pdf>

# CAPÍTULO 3

## AVALIAÇÃO DE CULTURAS DE ESCARRO PARA O DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE EM 2017

*Data de aceite: 01/10/2020*

*Data de submissão: 04/10/2020*

### Iaci Gama Fortes

Laboratório de Referência Municipal Boa Vista  
Centro Universitário Claretiano  
Boa Vista - RR  
<http://lattes.cnpq.br/0187585148841268>

### Lysia Alves Oliva

Centro Universitário Claretiano  
Boa Vista - RR  
<http://lattes.cnpq.br/4247729480360233>

### Bianca Melo Amorim

Centro Universitário Claretiano  
Boa Vista - RR  
<http://lattes.cnpq.br/7203805559956075>

### Karline Drieli Wottrich

Centro Universitário Claretiano  
Boa Vista - RR  
<http://lattes.cnpq.br/6424511276299770>

**RESUMO:** A cultura é um método sensível e específico para o diagnóstico das doenças causadas por micobactérias, principalmente para a tuberculose (TB) pulmonar e extrapulmonar. Entretanto, alguns cuidados devem ser tomados para que não ocorra contaminação da amostra clínica ou durante o procedimento do exame. O objetivo do estudo foi avaliar o número de culturas para micobactérias contaminadas no ano de 2017. Estudo retrospectivo, descritivo e quantitativo de culturas de escarro semeadas para a pesquisa

de micobactérias pelo método Ogawa-Kudoh no ano de 2017 realizado em um laboratório da rede pública do município de Boa Vista-RR. Foram utilizadas informações estatísticas e calculado média e porcentagem. No ano de 2017 foi observado um total de 2065 culturas realizadas, sendo que 88 (4,3%) culturas foram positivas, 1748 (84,6%) negativas e 229 (11%) culturas apresentaram-se contaminadas. O período de janeiro à julho apresentou número maior de culturas contaminadas (média de 25 culturas/mês) e entre agosto à dezembro o número de contaminação caiu para 10 culturas/mês. Nesse mesmo período houve atualização de certificação da cabine de segurança biológica, uso adequado da lâmpada UV para descontaminação do ambiente, descontaminação das estufas, oficina sobre coleta de escarro realizado pelo laboratório para as unidades básicas de saúde (coleta) no intuito de sensibilizar os profissionais sobre adequada coleta de escarro para o diagnóstico de TB. Portanto, observou-se a diminuição de culturas contaminadas após a execução de protocolos e sensibilização de profissionais sobre o diagnóstico de TB.

**PALAVRAS - CHAVE:** diagnóstico; escarro; tuberculose.

### EVALUATION OF SPUTUM CULTURES FOR THE DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS IN 2017

**ABSTRACT:** Culture is a sensitive and specific method for the diagnosis of diseases caused by mycobacteria, mainly for pulmonary and extrapulmonary tuberculosis (TB). However, some care must be taken to avoid contamination

of the clinical sample or during the exam procedure. The objective of the study was to evaluate the number of cultures for contaminated mycobacteria in the year 2017. Retrospective, descriptive and quantitative study of sputum cultures sown for mycobacteria research using the Ogawa-Kudoh method in 2017 carried out in a public laboratory of municipality of Boa Vista-RR. Statistical information was used and average and percentage were calculated. In 2017, a total of 2065 cultures were observed, of which 88 (4.3%) cultures were positive, 1748 (84.6%) negative and 229 (11%) cultures were contaminated. The period from January to July showed the highest number of contaminated cultures (average of 25 cultures / month) and between August and December the number of contamination dropped to 10 cultures / month. In the same period, certification of the biological safety cabin was updated, proper use of the UV lamp for decontamination of the environment, decontamination of the greenhouses, sputum collection workshop conducted by the laboratory for the basic health units (collection) in the process of raising awareness among professionals about adequate sputum collection for the diagnosis of TB. Therefore, there was a decrease in contaminated cultures after the execution of protocols and awareness of professionals about the diagnosis of TB.

**KEYWORDS:** diagnosis; sputum; tuberculosis.

## 1 | INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) foi conhecida, em meados do século XIX, como peste branca, vitimando milhares de indivíduos em todo o mundo, chegando a cerca de 30% da mortalidade geral. A partir da metade do século XX, houve redução da ocorrência e da mortalidade referente à enfermidade, principalmente em países desenvolvidos (BRASIL, 2019). A OMS descreve que TB é uma doença infecto contagiosa endêmica em diversos países, sendo uma das 10 principais causas de morte, sendo que em 2017, 10,0 milhões de pessoas desenvolveram a doença e foram estimadas 1,3 milhão de mortes decorrentes da infecção pelo bacilo (WHO, 2018). O Brasil está posicionado entre os 22 países com alta carga de TB, os quais são responsáveis por grande parte do número total de ocorrências da doença no mundo (MAIOR et al., 2012).

Ainda que hoje a TB seja uma doença que possui prevenção e cura, o índice da prevalência ainda é alto pela existência de comunidades não desenvolvidas economicamente (DUARTE et al., 2012).

A TB possui sete espécies que compõe o seu complexo *Mycobacterium tuberculosis*: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. pinnipedi* e *M. caprae* (BRASIL, 2019). O *M. tuberculosis*, conhecido também como bacilo de Koch (BK) é a espécie mais significativa por ter ocasionado mais mortes, até os mais recentes anos (CHIMARA; FERRAZOLI, 2009)

A doença pode ser transmitida por via respiratória através de uma pessoa infectada, por inalação de aerossóis (tosse, fala e espirro). Nesses aerossóis contém bacilos, que são facilmente inalados, atingindo rapidamente os alvéolos pulmonares. Para o diagnóstico laboratorial na rotina do Sistema Único de Saúde - SUS, realiza-se como testes a



baciloscopia, teste rápido molecular (TRM-TB) e cultura (BRASIL, 2019).

A cultura é um método sensível e específico para o diagnóstico das doenças causadas por micobactérias, principalmente para a tuberculose (TB) pulmonar e extrapulmonar. Neste exame é possível multiplicar e isolar os bacilos álcool-ácidos resistentes (BAAR) a partir do semeio do material em meios de cultivos específicos para micobactérias. Esse método é considerado o padrão ouro, por possuir praticamente 100% de especificidade e sensibilidade para identificar TB pulmonar e extrapulmonar (MAIOR et al., 2012; BRASIL, 2019). Entretanto, alguns cuidados devem ser tomados para que não ocorra contaminação da amostra clínica ou durante o procedimento do exame. Esses cuidados são observados durante coleta de amostras clínicas e/ou em métodos de descontaminação da amostra a ser analisada. Entretanto, ainda assim pode-se tornar possível a contaminação dessas culturas, por isso o objetivo do estudo foi avaliar o número de culturas para micobactérias com resultado de contaminação liberadas no ano de 2017.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado estudo retrospectivo, descritivo e quantitativo do número de culturas de escarro semeadas para a pesquisa de micobactérias pelo método Ogawa-Kudoh no ano de 2017 realizado em um laboratório da rede pública do município de Boa Vista-RR. Utilizou-se Hidróxido de sódio (NaOH) 4% como agente descontaminante para as amostras clínicas. Foram utilizadas informações estatísticas de relatórios e calculado média e porcentagem. Todas as amostras seguem um fluxo para realizar os testes que inicia na baciloscopia, cultura e TRM. Os resultados são registrados em planilhas específicas então final do mês é realizado um levantamento dos casos positivos, negativos e contaminado (para cultura). Esses casos são registrados em planilhas em forma de números. No caso da cultura, foram avaliados os números em cada mês.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ano de 2017 foi observado um total de 2065 culturas realizadas, sendo que 88 (4,3%) culturas foram positivas, 1748 (84,6%) negativas e 229 (11%) culturas apresentaram-se contaminadas (tabela 1). Considera-se culturas contaminadas aquelas com presença de fungos ou outras bactérias.

EXAMES REALIZADOS	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ	TOTAL
<b>CULTURA (+)</b>	7	17	15	10	5	3	2	3	3	7	12	4	<b>88</b>
<b>CULTURA (-)</b>	78	126	216	133	131	137	187	175	173	197	104	91	<b>1748</b>
<b>CULTURA CONTAMINADA</b>	26	23	37	27	14	28	20	9	10	16	9	10	<b>229</b>
<b>(%) CONTAMINAÇÃO</b>	23	14	14	16	9	17	10	5	5	7	7	10	<b>11</b>
<b>Nº TOTAL DE CULTURA</b>	111	166	268	170	150	168	209	187	186	220	125	105	<b>2065</b>

Tabela 1: Culturas de escarro realizadas em 2017.

O período de janeiro à julho apresentou número maior de culturas contaminadas (média de 25 culturas/mês) com variação de 23 - 9%. Entre agosto à dezembro o número de contaminação caiu para 10 culturas/mês e foi observou-se variação de porcentagem entre 5 - 11% (figura 1 e 2).

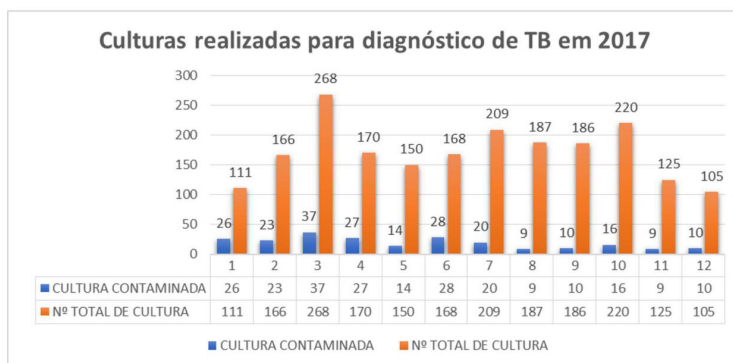


Figura 1 - Número de culturas realizadas e contaminadas em 2017.

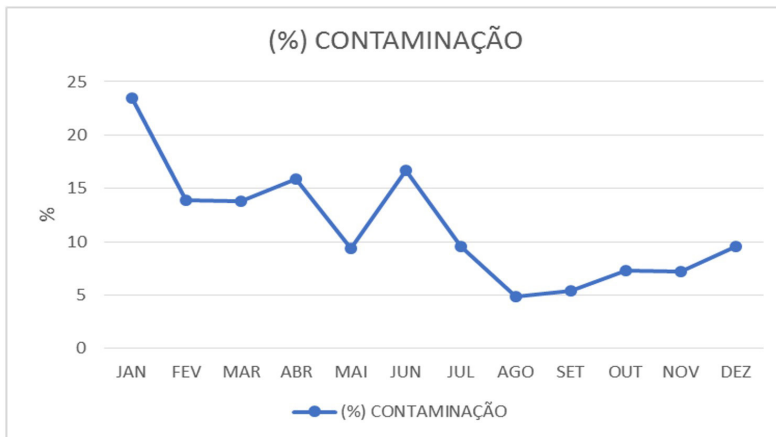


Figura 2 - Porcentagem de contaminação de acordo com o mês em 2017.

O semeio do método Ogawa-Kudoh segue etapa de descontaminação da amostra utilizando-se o hidróxido de sódio a 4% para amostras de escarro com controle do tempo, seguido pelo semeio da amostra no meio de cultura com posterior incubação a temperatura entre 35°C a 37°C para sua multiplicação, devido ao lento crescimento o meio deve permanecer incubado por até 8 semanas. Neste intervalo realiza-se leitura e/ou interpretação (caso positivo/negativo/contaminado). Para a realização da coleta o paciente precisa ser orientado pelo profissional da saúde, assim evitando erros de coleta e possível contaminação da amostra. A quantidade da amostra precisa ser ideal (5ml a 10 ml), coletado em local arejado e em recipiente adequado. A amostra deve ser processada o mais rápido possível, podendo ser armazenada por um curto tempo em lugar refrigerado até que ocorra seu processamento. Ainda assim, existe possibilidade de contaminação. A margem aceitável é de 3 a 5%. Valores mais altos podem indicar concentração muito baixa do reagente descontaminante, tempo curto de contato entre a amostra e a solução descontaminante, amostras mal conservadas durante o transporte ou o armazenamento, tempo muito longo entre a coleta da amostra e seu processamento, problemas na preparação do meio de cultura (solução salina não estéril, autoclave que não atinge a temperatura necessária, etc.) ou a presença de contaminantes no ambiente do laboratório e/ou na estufa de cultura (geralmente fungos ambientais) (BRASIL, 2008).

A porcentagem mensal de contaminação pode estabelecer relação entre boas práticas laboratoriais e coleta adequada. Vale destacar que as culturas com resultado contaminado, foram solicitadas novas amostras para repetir o teste.

A contaminação de um amostra pode está relacionada a diversas etapas da realização do teste. Isso inclui desde a coleta à incubação do semeio. O resultado desta análise evidenciou pistas à investigação do alto número de culturas contaminadas. Essas informações corroboram com as atividades que estavam sendo realizadas em paralelo

no setor para minimizar a contaminação. Esta análise foi realizada no mesmo período de ocorrência de procedimentos voltados a biossegurança, treinamento de equipe, entre outros.

Como apresenta a figura 2, entre agosto à dezembro o número de contaminação caiu para 10 culturas/mês. Quando avaliado os procedimentos, foi observado que no mesmo período houve atualização da certificação da cabine de segurança biológica, isso engloba trocas de filtros e calibração do equipamento, descontaminação das estufas, evento que já ocorria entretanto o período de intervalo foi ajustado, a gerência do laboratório realizou oficina sobre coleta de escarro para as unidades básicas de saúde (coleta) responsáveis por coletar amostras no intuito de sensibilizar os profissionais sobre adequada coleta de escarro para o diagnóstico de TB.

Além disso, tem-se observado que quando há intervenção educativa para coleta adequada, as amostras de escarro apresentam maior qualidade com aspecto e volume satisfatório para efetividade dos exames (SICSÚ et al., 2016). Isso evidencia a relação entre coleta e a possibilidade de contaminação.

O método de cultura permite o crescimento de outras micobactérias, que não somente o Complexo *M. tuberculosis*, chamadas micobactérias não causadora de tuberculose, também é fundamental para orientar a terapia antibiótica e monitoramento do tratamento, fatores estes que devem ser considerados para importância de se avaliar índices relacionados a este método (OLIVEIRA et al, 2016; BUSATTA et al., 2019).

## 4 | CONCLUSÃO

O presente estudo trouxe à luz a importância da realização dos procedimentos relacionados ao cuidado e manuseio de amostras e cultura para o diagnóstico de tuberculose. No laboratório, inicialmente foi identificado a ocorrência do alto número de culturas contaminadas e sugere-se que a diminuição deste índice pode estar relacionado com a execução de protocolos de controle de qualidade que controlam os procedimentos e sensibilização de profissionais sobre o diagnóstico de TB.

## REFERÊNCIAS

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias. – Brasília : Ministério da Saúde, 2008.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil – Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

BUSATTA, J. et al. Diagnóstico laboratorial da tuberculose e infecções causadas por micobactérias não tuberculosas (2018-2019). 2019. Disponível em: <http://www.eaex.uem.br/eaex2019/anais/artigos/11.pdf>  
Acesso em: 04/10/2020.

CHIMARA, E. FERRAZOLI, L. Diagnóstico bacteriológico da Tuberculose e outras micobacterioses. *Pneumologia Paulista*, v. 22, n. 5, 2009.

DUARTE, A. S. C.; DE SOUZA BRAGA, A. L.; DA SILVA BRAGA, S.N. A tuberculose pulmonar em ambiente hospitalar: uma revisão sobre o papel do enfermeiro. *Revista de Pesquisa Cuidado é Fundamental Online*, v. 4, n. 1, p. 2714-2722, 2012.

MAIOR, M de L. GUERRA RL. Time from symptom onset to the initiation of treatment of pulmonary tuberculosis in a city with a high incidence of the disease. *Jornal brasileiro de pneumologia: publicação oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia* vol. 38,2 : 202-9. 2012.

OLIVEIRA, G. DA S. CASTRO, G. R., LIMA, C., DA SILVA, J. X., NAVES, J. D. O. S., MONTEIRO FILHO, C. M. Identificação laboratorial de micobactérias em amostras respiratórias de pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar no Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF). *Journal of Health & Biological Sciences*, v. 4, n. 3, p. 187-192, 2016.

SICSU, Amélia Nunes et al . Intervenção educativa para a coleta de escarro da tuberculose: um estudo quase experimental. *Rev. Latino-Am. Enfermagem*, Ribeirão Preto , v. 24, 2703, 2016 .

WHO. Global tuberculosis report 2018. Switzerland: World Health Organization; 2018.

# CAPÍTULO 4

## AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRATOS FOLIARES DE *GALLESIA INTEGRIFOLIA* (SPRENG) HARMS (PHYTOLACCACEAE)

Data de aceite: 01/10/2020

**Julyanna Oliveira Castro**

Universidade Estadual de Santa Cruz

**Marcelo Schramm Mielke**

Universidade Estadual de Santa Cruz

**Aline Oliveira da Conceição**

Universidade Estadual de Santa Cruz

**RESUMO:** A ampla utilização de drogas antimicrobianas tem provocado a seleção de micro-organismos resistentes e, neste contexto, uma das alternativas mais promissoras são o estudo e o emprego de antimicrobianos de origem vegetal. A *Gallesia integrifolia* (Spreng) Harms, família Lecythidaceae, é uma espécie nativa da Floresta Atlântica utilizada em projetos de reflorestamento e como planta medicinal pela população; entretanto, estudos sobre sua atividade antimicrobiana são escassos. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi fornecer dados científicos a respeito dessa espécie quanto ao seu potencial antimicrobiano. Para tanto, avaliou-se a atividade antibacteriana e antifúngica de extratos aquosos das folhas de *Gallesia integrifolia* submetida a diferentes níveis de intensidade da luz durante crescimento do vegetal. Para o estudo, utilizaram-se fungos do gênero *Candida*; *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* e bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Utilizou-se o método de microdiluição em caldo, após o qual se procedeu

à determinação da concentração fungicida/bactericida mínima. Os resultados obtidos mostraram que os extratos não apresentaram propriedades antifúngicas. Contudo, observou-se ação bacteriostática sobre *E. coli* a 1000 µg. mL<sup>-1</sup>. A disponibilidade de radiação luminosa durante o desenvolvimento das plantas de *G. integrifolia* não exerceu influência sobre o potencial antimicrobiano de seus extratos. Assim, o presente estudo demonstrou a ação antibacteriana da espécie sobre *E. coli*, o que condiz com os dados da literatura que relatam a maior sensibilidade das bactérias Gram negativas sobre extratos de *G. integrifolia*, e sugere a continuidade nos estudos para elucidação das propriedades antimicrobianas dessa espécie vegetal.

**PALAVRAS - CHAVE:** Pau d’alho. Floresta Atlântica. Fitoterápicos.

**ABSTRACT:** The wide use of antimicrobial drugs has led to the selection of resistant microorganisms. In this context, one of the most promising alternatives is antimicrobials of plant origin. *Gallesia integrifolia* (Spreng) Harms, Lecythidaceae family, is a native species of the Atlantic Forest used in reforestation projects and as folk medicine; however, studies on its antimicrobial activity are scarce. Therefore, the objective of the present study was to provide scientific data about this species regarding its antimicrobial potential. For this purpose, the antibacterial and antifungal activity of aqueous extracts of *G. integrifolia* leaves submitted to different levels of light intensity during plant growth was evaluated. For the study, fungi of the

genus *Candida*; *C. albicans*, *C. krusei* and *C. parapsilosis* and bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were used. The microdilution broth method was used after which the minimum fungicide/bactericide concentration was determined. The results showed that the extracts had no antifungal properties. However, bacteriostatic action on *E. coli* at 1000 µg. mL<sup>-1</sup> was observed. The availability of light radiation during the development of *G. integrifolia* plants had no influence on the antimicrobial potential of their extracts. Thus, the present study demonstrated the antibacterial action of the species on *E. coli*, which matches the data in the literature reporting the higher sensitivity of Gram negative bacteria on *G. integrifolia* extracts, and suggests continuity in the studies for elucidation of the antimicrobial properties of this plant species.

**KEYWORDS:** antimicrobial; medicinal plant; Atlantic Forest; aqueous extract

## 1 | INTRODUÇÃO

A família Phytolaccaceae apresenta aproximadamente 13 gêneros e 60 espécies distribuídas amplamente na região tropical, possuindo representantes nas Américas Tropical e Subtropical, na África e na Ásia Oriental.

Alguns gêneros dessa família, destacando-se o *Gallesia* Casar, limitam-se à região da América do Sul, compreendendo Bolívia, Brasil, Equador e Peru (STEINMANN, 2010). A *Gallesia integrifolia* (Spreng) Harms é a única representante do seu gênero, sendo uma espécie nativa do Brasil com ocorrências confirmadas em quatro domínios fitogeográficos: Cerrado, Caatinga, Amazônia e Mata Atlântica (MARCHIORETTO, 2015).

Essa espécie é conhecida popularmente como pau-d'alho ou, em Tupi, por ibirarema, que significa "árvore ruim", devido ao cheiro característico de alho que exala de todos os órgãos da planta (AKISUE, 1986). Tal propriedade é explicada pela presença de metabólitos secundários extremamente voláteis constituídos por grupos sulfurados como a dimetil sulfona, o metil metano tiosulfonato e o 1-metilsulfonil-2,3-ditiobutano (BARBOSA, 1997, 1999). Boa parte dos metabólitos secundários está relacionada com mecanismo de defesa natural da planta, possuindo propriedades antimicrobianas, antiparasitárias, antissépticas e anestésicas, qualidades essas que tornam esses compostos fitoquímicos promissores como fontes para o desenvolvimento de novos fármacos (FERNANDES JÚNIOR et al. 2014).

Usos medicinais populares desta espécie vegetal foram relatados em muitos estudos etnofarmacológicos em diferentes países de sua ocorrência (BUSSMANN, 2010; BOTTAZZI, 2013). Na medicina popular, a sua forma de uso se dá por meio de chás realizados com folhas e cascas no tratamento de tosses, dores de garganta, diarreia, asma, reumatismo, infecções de pele e garganta e combate a helmintos (BARBOSA, 1997; AGRA, 2008; BIESKI, 2015). Carvalho (1994) observou que a espécie também possui função de repelente natural a vários insetos graças à volatilidade de seus constituintes químicos. Além disso, as preparações de diferentes partes da planta estão indicadas em alguns países latino-americanos nos tratamentos de infecções (bacterianas e fúngicas) e

manejo de abscessos por diferentes grupos étnicos na Bacia Amazônica (DUKE, 2009).

Estudos científicos comprovam o potencial antibacteriano (BUSSMANN, 2010; ARUNACHALA, 2016), antifúngico (FREIXA et al., 1998) e antiviral (ADEMIR, 2013) de extratos feitos a partir da casca do caule e folhas de indivíduos adultos de *G. integrifolia*. Entretanto, embora haja evidências de atividade antimicrobiana preliminar com extratos de casca e folha de *G. integrifolia*, pouco se sabe sobre a ação de extratos foliares de mudas submetidas a diferentes níveis de radiação luminosa dessa espécie, ainda que estudos já apontem a sua grande capacidade adaptativa a diferentes condições de sombreamento (FEIJÓ, 2008).

Para esse estudo, foram selecionados micro-organismos de relevância clínica tais como os fungos do gênero *Candida* e as bactérias Gram- negativa *Escherichia coli* e Gram-positiva *Staphylococcus aureus*.

O gênero *Candida* é constituído por leveduras com reprodução sexuada e assexuada, com mais de 200 espécies, onde aproximadamente 20 são consideradas patogênicas (GIORDANI, 2015; LACAZ, 2002; MEIRELES, 2009). Essas leveduras fazem parte da microbiota natural do corpo dos animais, colonizando a pele e as mucosas dos trato digestivo, urinário, bucal e vaginal e, são consideradas o principal grupo de fungos patógenos oportunistas. Dessa maneira, a candidíase é na maioria das vezes de origem endógena, ocorrendo como consequência de um distúrbio imunológico do hospedeiro ou por fatores de virulência destas leveduras, que possuem habilidade de colonizar, penetrar e invadir o tecido (BROWN, 2007; HOLLENBAC, 2008).

A candidíase representa um problema de saúde pública, pois a resistência de isolados aos antifúngicos convencionais e os relatos de reincidências da enfermidade, em especial nos pacientes imunodeficientes ou em tratamentos prolongados com antibióticos, (SANGLARD, 2002; COLOMBO, 2003; POZZATTI, 2010; AHMAD, 2011) vem fazendo com que o gênero *Candida* seja objeto cada vez mais presente em estudos relacionados à atividade antimicrobiana (DUARTE, 2005).

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa que se encontra naturalmente no trato digestório do homem. Sendo que, dentre seus diversos sorotipos, cinco foram identificados como patogênicos (FORSYTHE, 2013). Tal bactéria é amplamente utilizada como indicador em estudos e análises de contaminação fecal da água e de alimentos, por ser facilmente isolada e identificada. A contaminação por este patógeno pode provocar quadro clínico de diarreia, febre, vômitos entre outras complicações (SILVA JR, 1995; JAY, 2005).

A *Staphylococcus aureus*, por sua vez, é uma bactéria do grupo dos cocos Gram-positivos que também faz parte da microbiota humana e pode ser encontrada em diversas partes do corpo, como fossas nasais, garganta, intestinos e pele, podendo se alojar no tecido e provocar lesões, caso as barreiras naturais, pele e mucosas, estejam comprometidas por trauma ou cirurgia (ROBERT; CHAMBERS, 2005; VELÁZQUEZ-MEZA, 2005). As doenças



provocadas por essa bactéria podem ser decorrentes da invasão direta dos tecidos, ou, devido às toxinas que ela produz, acarretando doenças que vão desde uma infecção simples, como espinhas e furúnculos, até as mais graves, como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico e septicemia (SCHECHTER; MARANGONI, 1998; BRAUNWALD, 2002; ANDRIOLO, 2005). A *S. aureus* foi uma das primeiras bactérias a serem controladas com a descoberta dos antibióticos, mas, devido a sua enorme capacidade de adaptação e resistência, tornou-se uma das espécies de maior importância no quadro das infecções hospitalares e comunitárias (SANTOS, 2007).

De acordo com Zuzarte (2012), as pesquisas por novas substâncias fitoquímicas capazes de combater infecções microbianas, ou mesmo melhorar a ação dos antimicrobianos comumente usados na medicina, tem se mostrado uma tendência promissora na busca de avanços contra a resistência e a redução nas limitações dos tratamentos convencionais, como efeitos adversos e a alta toxicidade dos antimicrobianos sintéticos comerciais.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar se extratos de *G. integrifolia* apresentavam atividade antimicrobiana, que além de contribuir para descobertas farmacológicas, atua na valorização e resgate da cultura popular, uma vez que o uso dessa planta com intenção medicinal já é um hábito incorporado em algumas comunidades, e agrega importância na preservação da espécie por se tratar de uma planta com propriedades medicinais.

## 2 | METODOLOGIA

### 2.1 Coleta do material vegetal

Este estudo foi desenvolvido em área experimental no Campus Soane Nazaré de Andrade, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Rodovia Jorge Amado, km 16, Bairro Salobrinho, localizado no município de Ilhéus, BA, nas coordenadas 39°13'59" de longitude oeste e 14°45'15" de latitude sul. Para tal, foram utilizadas mudas de *Gallesia integrifolia* com 90 dias de idade, adquiridas no viveiro do Instituto Floresta Viva (IFV) localizado no distrito de Serra Grande, Uruçuca, BA ([www.florestaviva.org.br](http://www.florestaviva.org.br)).

As mudas foram plantadas em sacos plásticos com capacidade de 1,5 litros que foram condicionados em tubos de PVC de 100 mm de diâmetro com 250 mm de altura com orifícios de drenagem. Após o plantio, as plantas, foram submetidas, durante 77 dias, a três tratamentos de disponibilidade de radiação luminosa: T1 (5,9 mol fótons m<sup>-2</sup> dia<sup>-1</sup>) T2 (2,3 mol fótons m<sup>-2</sup> dia<sup>-1</sup>) e T3 (1,1 mol fótons m<sup>-2</sup> dia<sup>-1</sup>), obtidos por meio de casas de sombras cujas dimensões foram de 1,2 x 1,2 x 1,0 m, com diferentes graus de cobertura de tela. As medidas de radiação foram obtidas por meio dos sensores quânticos presentes em cada casa. Das 15 mudas presentes em cada tratamento, foram coletadas as folhas que seguiram para secagem em estufa de circulação forçada de ar a 60°C.

## 2.2 Obtenção do extrato

Extratos aquosos foram obtidos a partir das folhas de cada um dos três tratamentos identificados por T1, T2 e T3 (seção 2.1). Para tanto, pesou-se 5g de folhas trituradas que foram transferidas para béqueres com 200 mL de água destilada. Procedeu-se à fervura durante 10 minutos, após a qual, as soluções foram filtradas para remoção de grandes partículas e transferidas para tubos de polipropileno de 50 mL esterilizados. As soluções foram então submetidas ao processo de liofilização com equipamento Freeze dryer (Freezone 6 - Labconco, Kansas City, MO) (ROZWALKA, 2008).

## 2.3 Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados para o estudo foram os fungos leveduriformes *Candida albicans*, ATCC 14057; *C. parapsilosis*, ATCC 22018; *C. krusei*, ATCC 6258, gentilmente cedidos pelo Dr. Sydney Hartz Alves do Laboratório de Pesquisa em Micologia (LAPEME) da Universidade Federal de Santa Maria, e as bactérias *Staphylococcus aureus* INCQS 00249 (ATCC 25904) e *Escherichia coli* EPEC INCQS 00182 (CDC 086H35), da coleção de micro-organismos de referência em vigilância sanitária – CMRVS, FIOCRUZ-INCC, Rio de Janeiro, RJ.

## 2.4 Preparação dos inóculos fúngicos

Os inóculos fúngicos foram preparados por meio de diluição de amostras, retiradas de um pré-cultivo em ágar Sabouraud dextrose (ASD) com cloranfenicol ( $50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), em solução salina a 0,9% seguido por contagem em câmara de Neubauer para padronizar a amostragem em  $2.5 \times 10^3$  células. $\text{mL}^{-1}$ , valor recomendado para testes de suscetibilidade aos antimicrobianos (NCCL, 2002).

## 2.5 Preparação dos inóculos bacterianos

Os inóculos bacterianos foram preparados tomando-se uma ou mais alçadas de colônias mantidas em ágar nutriente e diluindo-a em solução salina a 0,9%, até atingirem a turbidez correspondente ao tubo 0,5 da escala de Mac-Farland (NCCL, 2006).

## 2.6 Determinação da concentração inibitória e fungicida mínima (CIM) frente a leveduras do gênero *Candida*

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos vegetais, utilizou-se o teste de microdiluição em caldo de acordo com a Norma M27-A2 (CLSI, 2002) com modificações. Realizou-se diluição seriada dos extratos aquosos a partir de uma solução mãe a  $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  em meio RPMI para as concentrações de 3,9 a  $500\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Um volume das concentrações dos extratos ( $100\mu\text{L}$ ) foi distribuído em placas de 96 orifícios em triplicata e adicionados de  $100\mu\text{L}$  de solução contendo  $2.6 \times 10^3$  UFC. $\text{mL}^{-1}$  de leveduras. Como controles, utilizou-se: Clorexidina 1% ( $100\mu\text{L}$  de levedura +  $100\mu\text{L}$  da clorexidina); Meio RPMI ( $200\mu\text{L}$  de Meio RPMI); Levedura ( $100\mu\text{L}$  da levedura +

100 $\mu$ L de Meio RPMI); Extrato controle (100 $\mu$ L do extrato na concentração mais elevada + 100  $\mu$ L de Meio RPMI); Extrato teste (100 $\mu$ L Extrato nas diferentes concentrações + 100 $\mu$ L de levedura. As microplacas foram incubadas por 48 h a 36  $\pm$ 1 $^{\circ}$ C, após o qual foram observadas de modo que a turbidez foi o critério utilizado para ratificar o crescimento de levedura. Posteriormente, 10  $\mu$ L de cada amostra localizada no meio da triplicata foram transferidos em forma de *spots* para placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose (ASD) com cloranfenicol (50 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>). Por fim, as placas de Petri foram armazenadas a 36 $\pm$ 1  $^{\circ}$ C. O crescimento das leveduras ou ausência dele foi observado após 24 horas.

## **2.7 Determinação da concentração inibitória e bactericida mínima (CIM) frente às bactérias *E. coli* e *S. aureus***

A CIM foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo de infusão de cérebro e coração (*Brain Heart Infusion* – BHI) em microplacas de 96 orifícios, de acordo com a metodologia descrita segundo a norma M7-A7 do Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006), com modificações. Os orifícios foram preenchidos com 90  $\mu$ L do meio BHI e, em seguida, acrescentaram-se 90  $\mu$ L das soluções de extratos vegetais e fez-se a diluição seriada de 7,81 a 1.000  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>, de modo que os 90  $\mu$ L restantes da última diluição, foram descartados. Logo, todos os poços tinham 90  $\mu$ L de meio acrescido da amostra. O preparo dos micro-organismos sucedeu-se a partir da mistura de uma amostra de cada bactéria até atingir turvação igual à suspensão do tubo 0,5 da escala McFarland (aproximadamente 1,0 x 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>) em frascos de vidro estéreis contendo 4 mL de NaCl 0,9%. Ulteriormente, distribuíram-se 10  $\mu$ L das suspensões das bactérias em cara orifício.

Como controles, utilizaram-se: Cloranfenicol (50 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) (10 $\mu$ L de bactéria + 90  $\mu$ L do cloranfenicol); Caldo BHI (100 $\mu$ L de Caldo BHI); Bactéria (10 $\mu$ L da levedura + 90 $\mu$ L de Caldo BHI); Extrato controle (100 $\mu$ L do extrato + 100  $\mu$ L de Caldo BHI); Extratos testes (90 $\mu$ L do extrato + 90  $\mu$ L de Caldo BHI + 10 $\mu$ L de bactéria). O volume final em cada poço foi de 0,1 mL. Os tratamentos foram distribuídos por microplacas de 96 poços, em triplicata, para cada uma das espécies de bactérias: *E. coli* e *S. aureus*.

As microplacas foram incubadas a 36 $\pm$ 1  $^{\circ}$ C por 24 horas, para que, posteriormente, os tratamentos fossem distribuídos em placas de Petri contendo 20 mL de ágar nutriente (AN) com cloranfenicol (50 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>). Transferiram-se 10  $\mu$ L de cada amostra localizada no meio da triplicata. Por fim, as placas de Petri foram armazenadas a 36 $\pm$ 1  $^{\circ}$ C. O crescimento das bactérias ou ausência dele foi observado após 24 horas. Transcorrido o tempo de crescimento bacteriano, realizou-se a interpretação dos resultados da seguinte maneira: nas placas onde não houve crescimento microbiano o extrato foi considerado como tendo ação bactericida e naquelas cuja ação inibitória foi observada na placa de 96 orifícios, mas onde houve crescimento do micro-organismo no subcultivo, o extrato foi considerado como tendo ação bacteriostática.

Também foram realizadas leituras com o revelador resazurina (0,01mg.mL<sup>-1</sup>) a qual

10µL foram adicionados em cada poço das microplacas nos testes com bactérias. No decorrer de 2 horas a presença de cor azul foi interpretada como ausência de crescimento e a presença de cor rosa, crescimento bacteriano.

### 3 I RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos utilizando o método de microdiluição para determinação da atividade antifúngica demonstraram que nenhum dos extratos apresentou ação inibitória sobre as espécies de *Candida* utilizadas no estudo (Fig. 1).

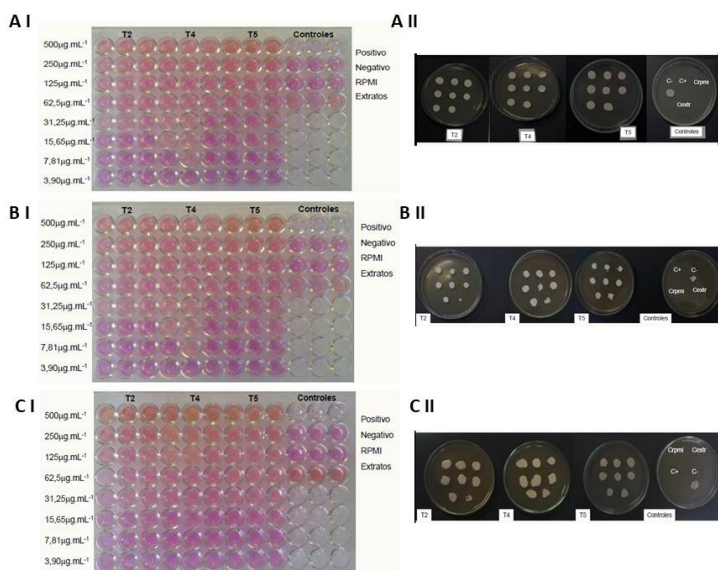


Figura 1. Determinação da concentração inibitória mínima (I) e concentração fungicida mínima (II) dos extratos de *G.integrifolia* submetida a diferentes tratamentos de disponibilidade de radiação luminosa. A – *Candida albicans*; B – *C. krusei*; C – *C. parapsilosis*. T1 (5,9 mol fótons m<sup>-2</sup> dia<sup>-1</sup>); T2 (2,3 mol fótons m<sup>-2</sup> dia<sup>-1</sup>); T3 (1,1 mol fótons m<sup>-2</sup> dia<sup>-1</sup>).

Fonte: Dados da pesquisa

A microdiluição é um método que possui vantagens quando se refere a produtos naturais, uma vez que esses são obtidos em poucas quantidades. Além disso, é uma técnica de baixo custo, simples, rápida, e mais sensível que outros métodos usados na literatura, de alto rendimento e que permite determinar a CIM dos produtos em estudo (ELOFF, 1998; COWAN, 1999; GABRIELSON, 2002; LANGFIELD, 2004; CUSHNIE, 2005; ALVES, 2008; OSTROSKY, 2008; SALAZAR-ARANDA, 2009; PALOMBO, 2011). Apesar de possuir algumas limitações, tais como células de alguns micro-organismos que se aderem

à base do poço, precipitação de compostos presentes em alguns extratos e a coloração do extrato que em altas concentrações podem acabar interferindo na análise, essa técnica ainda apresenta vantagens de uso sobre outras técnicas (OSTROSKY, 2008).

O único relato encontrado na literatura de testes antifúngicos usando a *G. integrifolia* foi o estudo desenvolvido por Freixa e colaboradores (1998), que visava à busca por novos compostos antifúngicos, e para tal foram selecionadas 19 espécies latino-americanas de plantas utilizadas em medicina tradicional para vários fins, dentre essas se encontrava a *G. integrifolia*, a qual segundo Sanz e Campos (2009) a raiz é muito utilizada por comunidades peruanas para o tratamento de reumatismo. No trabalho de Freixa et al. (1998) foram desenvolvidos dois extratos feitos com solventes diferentes, o metanol e o diclorometano, e a avaliação do potencial antifúngico foi realizada pelo método de difusão em ágar, variante disco. O resultado obtido demonstrou que o extrato de diclorometano (10 mg / disco) da casca de raiz da *G. integrifolia* apresentou atividade antifúngica contra *Candida albicans* ATCC 10231, *Cladosporium cladosporioides* CECT 2111, *Cryptococcus neoformans* CECT 1075, *Fusarium oxysporum* var. *pinaster*, *Microsporium gypseum* CECT 2908, *Penicillium purpurogenum* CECT 2314, *Saccharomyces cerevisiae* CECT 1324 e *Tricophyton mentagrophytes* CECT 2795, demonstrando assim a presença de substâncias bioativas nessa espécie.

Comparando-se com os resultados do presente estudo, infere-se que duas variáveis podem estar atuando nesse potencial antifúngico encontrado por Freixa et al. (1998): o solvente e o órgão da planta que é utilizado. A obtenção do composto biologicamente ativo a partir de um material vegetal é dependente do tipo de solvente usado no processo de extração (DAS, 2010). Na extração de compostos hidrofílicos, por exemplo, são usados solventes polares tais como metanol, etanol ou acetato de etila. Já para compostos mais lipofílicos, são usados diclorometano ou uma mistura de diclorometano / metanol na proporção de 1:1 (SASIDHARAN, 2011). Uma vez que a polaridade do solvente reflete na eficiência da extração para as diferentes substâncias presentes no tecido vegetal, uma das explicações para os dados de atividade antifúngica desse estudo não condizerem com o potencial relatado na literatura é a diferença de polaridade entre os solventes escolhidos, visto que a água é um solvente polar e o diclorometano é um composto apolar imiscível em água com alta capacidade de dissolução de solventes orgânicos (AFONSO, 2009).

A outra justificativa se baseia nas diferentes taxas de síntese e acúmulo de metabólitos secundários, denominados de princípios ativos, que são os principais responsáveis pela atividade biológica presente nos vegetais, de acordo com o órgão da planta. Para as plantas, estas substâncias possuem a função de melhorar suas condições de sobrevivência no ambiente, atuando com atividades de proteção contra pragas e doenças, atração de polinizadores, ação alelopática, etc. Esses compostos não são estáveis e nem se distribuem de maneira homogênea, podendo assim, estarem concentrados nas raízes, rizomas, ramos, caules, folhas, sementes ou flores. Ademais, seus teores variam de acordo

com a época do ano, hora de coleta, solo ou clima onde vive a planta (CORRÊA, 1998)

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada por meio da determinação da menor quantidade dos extratos em estudo necessário para inibir o crescimento das bactérias de interesse. Para tal, assim como para testar a atividade antifúngica, para a atividade antimicrobiana, usou-se o método de microdiluição para indicação da CIM e o subcultivo em placas de Petri para determinação da CBM.

Pôde-se observar que no teste realizado com *E. coli* (Fig. 2), ao adicionar a resazurina, a primeira linha de poços apresentou coloração azulada indicando a inibição do crescimento dessa bactéria nas maiores concentrações de todos os extratos. Já no teste realizado com a bactéria *S. aureus*, a reação com resazurina detectou viabilidade celular (coloração rósea) em todos os poços com amostras, ou seja, houve ausência de inibição do crescimento destas bactérias pelos extratos aquosos obtidos de *G. integrifolia* submetida a diferentes disponibilidades de radiação luminosa. A coloração rósea indica a oxi-redução da resazurina em resarufina, reação essa gerada por meio do ganho de hidrogênio por flavinas ligadas a enzimas relacionadas com o sistema de transporte durante o metabolismo celular, indicando, portanto, a presença de bactérias viáveis (KONEMAN, 1997).

No caso da determinação da CBM, pode-se constatar que houve crescimento bacteriano, tanto da *E. coli* quanto da *S. aureus*, nas placas, indicando assim que os extratos nas maiores concentrações possuem ação somente bacteriostática (inibição do desenvolvimento das bactérias) sobre *E. coli*.

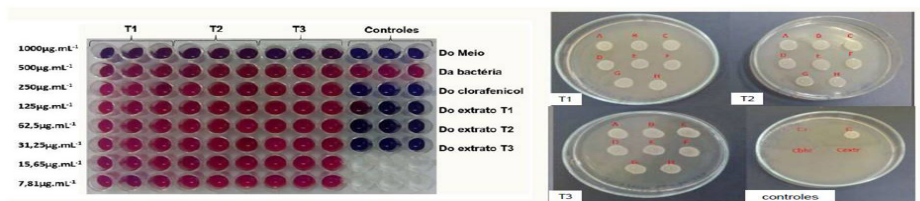


Figura 2. Determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima dos extratos de *G.integrifolia* submetida a diferentes tratamentos de disponibilidade de radiação luminosa sobre *Escherichia coli*. T1 (5,9 mol fótons m<sup>-2</sup> dia<sup>-1</sup>); T2 (2,3 mol fótons m<sup>-2</sup> dia<sup>-1</sup>); T3 (1,1 mol fótons m<sup>-2</sup> dia<sup>-1</sup>).

Fonte: Dados da pesquisa.

Os resultados obtidos da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima dos extratos de *G. integrifolia* estão resumidos na Tabela 1.

Extrato de <i>G.integrifolia</i> ( $\mu\text{g. mL}^{-1}$ )	<i>E. coli</i> (ATCC 22018)		<i>S. aureus</i> (ATCC 25904)	
	CIM	CBM	CIM	CBM
T1	1.000	-	-	-
T2	1.000	-	-	-
T3	1.000	-	-	-

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos de *G. integrifolia* submetida a diferentes disponibilidade de radiação luminosa frente a *E. coli* e *S. aureus*.

Legenda: T1 - 5,9 mol fótons  $\text{m}^{-2} \text{dia}^{-1}$ ; T2 - 2,3 mol fótons  $\text{m}^{-2} \text{dia}^{-1}$ ; T3 - 1,1 mol fótons  $\text{m}^{-2} \text{dia}^{-1}$ .

Fonte: Dados da pesquisa

Analisando os resultados obtidos dos extratos aquosos de folhas da *G. integrifolia*, observa-se que esses apresentaram apenas potencial de ação antimicrobiana frente a *E. coli*, onde foi comprovado efeito inibitório com ação bacteriostática na maior concentração. Essa resposta condiz com dados encontrados na literatura sobre o potencial antibacteriano dessa espécie vegetal, cujos resultados demonstraram que bactérias Gram-negativas são mais sensíveis aos compostos extraídos da *G. integrifolia* quando comparado com testes em bactérias Gram-positivas (ARUNACHALAM, 2016).

No estudo de Arunachalam et al (2016) foi avaliado a atividade antibacteriana *in vitro* e *in vivo* e o modo de ação do extrato hidroetanólico da casca do caule de *G. integrifolia*. A atividade antibacteriana foi avaliada pelo método de microdiluição contra onze cepas de bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* e *Shigella flexneri*). Neste estudo, também foi estabelecido o modo de ação do extrato o qual foi pela permeabilidade da membrana externa, vazamento de nucleotídeos e ensaios de efluxo de potássio. Os resultados desse estudo demonstraram que os extratos tinham ação bacteriostática mais ativa sobre bactérias Gram-negativas e que houve associação com o modo de ação das substâncias vegetais a mudanças da membrana bacteriana causada por um aumento de sua permeabilidade.

As bactérias Gram-negativas são mais resistentes aos antibióticos pela presença de uma membrana exterior da parede celular bacteriana que atua como uma barreira seletiva (VAARA, 1983). Assim, alguns antibióticos não são capazes de se infiltrar na membrana desses organismos e com isso não apresentam eficácia frente a essas bactérias (YI;ZHU;FU, 2010).

Esses resultados sugerem então que a atividade dos compostos de extrato aquoso das folhas de *G. integrifolia* contra bactérias Gram-negativas está relacionada à

sua capacidade de atuação sobre a permeabilidade da membrana celular desses microorganismos, apresentando-o portanto como um fitoterápico promissor contra esses patógenos.

Visto que, os três extratos obtiveram a mesma ação apresentando atividade apenas na maior concentração contra a *E. coli*, a disponibilidade de radiação luminosa durante o desenvolvimento das plantas de *G. integrifolia* pareceu não exercer influência sobre os constituintes com potencial antimicrobiano presentes nas folhas, apesar da incidência de luz solar ser um fator que afeta a produção dos compostos bioativos nos vegetais (YARZA, 1982). Isso demonstra, portanto, que essas substâncias podem estar sendo produzidas constitutivamente.

Conclui-se que os resultados obtidos no presente estudo vêm contribuir para descobertas farmacológicas de espécies do gênero *Gallesia*, atuar na valorização e resgate da cultura popular e agregar importância na preservação da espécie *G. integrifolia* por se tratar de uma planta com propriedades medicinais.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto Floresta Viva, pelo fornecimento das mudas utilizadas nesse estudo, e a colaboração de Thomas Domiciano Vieira, MSc. Marúcia da Cunha Fagundes, MSc. Luciana Lobo Santos e Dra. Ândrea Carla Dalmolin, pelo auxílio na instalação e no desenvolvimento do experimento. Marcelo S. Mielke agradece ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa (305477/2018-8).

## REFERÊNCIAS

ADEMIR, de J. S; et al. Chemical composition and antinociceptive, anti-inflammatory and antiviral activities of *Gallesia gorazema* (Phytolaccaceae), a potential candidate for novel anti-herpetic phytochemicals. **Journal of Ethnopharmacology** v.150, Ed. 2, p. 595-600. 2013.

AFONSO,S; SILVA,R.R. ; SOUZA,E.B.R. ; SCARMÍNIO,I.S. **Influencia do solvente extrator no processo de extração de metabólitos secundários da *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill pelos parâmetros de Snyder.** 49º Congresso Brasileiro de Quimica. Porto Alegre/RS, 2009.

AGRA, M.D.F. et al..Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileiras de Farmacognosia.** v.18, p. 472–508, 2008.

AHMAD, A. et al. Antifungal activity of *Coriaria nepalensis* essential oil by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **Yeast**, v. 28, p.611-617, 2011.

ALVES, E.G. et al. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.

AKISUE,M.K.,G,F.D. Caracterização farmacognóstica de Pau d'Alho *Gallesia integrifolia* (Spreng.)



harms. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.1, p.166-152. 1986.

ANDRIOLO, A. Guias de medicina ambulatorial e hospitalar. São Paulo: **Editora Manole**, 2005.

ARUNACHALAM, K, et al. *Gallesia integrifolia* (Spreng.)Harms: In vitro and in vivo antibacterial activities and mod of action. **Jornal Ethnopharmacol**. Epub. v.184, p128-137. 2016.

BARBOSA, L.C.A.; DEMUNER, A.J; TEIXEIRA,R.R; MADRUGA,M.S.Vitamin E and others chemical constituents from the leaves of *Gallesia gorazema*. **Fitoterapia** v.58, p.515–519,1997.

OSA,L.C.A.,DEMUNER,A.J.,TEIXEIRA,R.R.,MADRUGA,M.S.Chemicalconstituents of the bark of *Gallesia gorazema*. **Fitoterapia** v.70, p.152–156, 1999.

BIESKI,I.G.C.,LEONTI,M et al.. Ethnobotanical study of medicinal plants by population of valley of Juruena region, legal Amazon, Mato Grosso, Brazil. **Jornal Ethnopharmacol** D.T.D.O. 2015.

BOTTAZZI,P. et al..Productive diversification and sustainable use of complexsocial-ecological systems: acomparative study of indigenous and settler communities in the Bolivian Amazon. **Agroecol Sustain Food Syst**. v. 38, p. 137–164, 2013

BRAUNWALD, E. et al. *Medicina Interna*. 15. ed. Rio de Janeiro: **Mcgraw-Hill Interamericana do Brasil**, 2002.

BROWN, AJ, ODDS FC, GOW NA. Infection-related gene expression in *Candida albicans*. **Curr Opin Microbiol**. v.10, p.307-313, 2007.

BUSSMANN,R.W.,GLENN,A.,SHARON,D. Antibacterial activity of medicinal plants of northern peruvian traditional applications provide leads for modern science? **Indian Journal Traditional Knowl**.v.9, p.742–753, 2010.

CARVALHO, P.E.R. Espécies florestais brasileiras: Recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. **EMBRAPA – CNPF**; Brasília. 604p. 1994.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.5, p.599-607, 2003.

CORREA, A. D.; SIQUEIRA B, R; QUINTAS, L. E. M. **Plantas Medicinais: do cultivo à terapêutica**. Petrópolis, RJ. Vozes, 246p. 1998

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564–582, 1999.

CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids – Review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343-356, 2005.

DAS, K.; TIWARI, R.K.S.; SHRIVASTAVA, D.K. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 2, p. 104-111, 2010.

DUARTE, M.C. et al. Anti-*Candida* activity of brazilian medicinal plants. **Journal of**

**Ethnopharmacology**, v.97, p. 305-311, 2005.

DUKE, J.A. Duke's Hand book of Medicinal Plants of Latin America. CRC Press, **Taylor&Francis Group**, 2009.

ELOFF, J.N. A Sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plants extract for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, n. 8, p. 711-713, 1998.

FEIJÓ, N.S.A. et al. Growth and photosynthetic responses of *Gallesia integrifolia* (Spreng.) Harms and *Schinus terebinthifolius* Raddi seedlings in dense shade. **Agroforest Syst.** v. 77 p.49–58, 2008.

FERNANDES JÚNIOR, A. et al. Medicinal Plants from the Brazilian Savanna with Antibacterial Properties. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 4, p.1-13, 2014.

FORSYTHE, S. J. Microbiologia da Segurança Alimentar. 2. ed. Porto Alegre, **Artmed**, 2013.

FREIXA, B., Vila, R., Vargas, L., Lozano, N., Adzet, T., Cañigueral, S. Screening for antifungal activity of nineteen latin American plants. **Phytotherapy Res.** v.12, p.427–430, 1998.

GABRIELSON, J. et al. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **Journal of Microbiological Methods**. v. 50, p. 63 – 73, 2002.

GIORDANI, C.; SANTIN, R.; CLEFF, M.B.. Levantamento de extratos vegetais com ação anti-Candida no período de 2005-2013. **Rev. bras. plantas med.** Botucatu, v. 17, n. 1, p. 175-185, 2015.

HOLLENBACH, E 2008. Invasive candidiasis in the ICU: evidence based and on the edge of evidence. **Mycoses** 51: 25-45.

JAY, J. M. Microbiologia de alimentos. 6. ed. Porto Alegre, **Artmed**, 2005.

KONEMAN. E.W, et al. (Editors). Diagnostic microbiology. **Color atlas and text book**. 5a<sup>a</sup> ed. New York: Lippincott; 1997.

LACAZ, C.S. Tratado de micologia médica. 9.ed., São Paulo: **Sarvier**, 2002, 1104p.

LANGFIELD, R.D. et al. Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galioides*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 2-3, p. 279-281, 2004.

MARCHIETTO, M.S. 2015. Phytolaccaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB12578>>. Acesso em: 09 Nov. 2017

MEIRELES, M.C.A.; NASCENTE, P.S. Micologia Veterinária. 1ed. Pelotas: **Editora Universitária da UFPel**, 2009. 543p.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Second Edition. **CLSI document M27-A2** (ISBN 1-56238-469-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2002.

CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. **CLSI document M7-A7**. Approved Standard—Seventh Edition, which describes standard broth dilution (macrodilution and microdilution) and agar dilution techniques for measuring the in vitro susceptibility of bacteria to antimicrobial agents, 2006.

OSTROSKY, E. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PALOMBO, E.A. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potencial application in the prevention and treatment of oral diseases. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-15, 2011.

POZZATTI, P. et al. Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils. **Mycoses**, v.53, n.1, p.12-5, 2010.

ROBERT, S.; CHAMBERS, S. Diagnosis and management of *Staphylococcus aureus* infections of the skin and softtissue. **International Medicine Jornal**, v. 35, p. 97S-105S, 2005.

ROZWALKA, L.C.; LIMA, M.L.R.Z.C.; MIO, L.M.M.; NAKASHIMA, T. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerela cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, v.38, p.301-307, 2008.

SANGLARD, D.; ODDS, F.C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **The Lancet Infections Diseases**, v.2, n.2, p.73-85, 2002.

SALAZAR-ARANDA, R. et al.. Antimicrobial and antioxidant activities of plants from northeast of Mexico. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-6, 2009.

SANTOS, A. L., et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar **Jornal Brazilian Patology Medicine Laboratorial**. v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SANZ J.J., CAMPOS.C, M. E.R. A first survey on the medicinal plants of the Chazuta valley (Peruvian Amazon). **Jornal Ethnopharmacol**. v.122, p.333-362, 2009.

SASIDHARAN, S. et al. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. African **Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2011.

SCHECHTER, M.; MARANGONI, D. V. Doenças infecciosas: conduta, diagnóstico e terapêutica. 2. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 1998.

SILVA JR, E. A. Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Serviços de Alimentação, São Paulo: **Varela**, 1995.

STEINMANN, VW (2010). Neotropical Phytolaccaceae. In: Milliken, W., Klitz rd, B. & Baracat, A. (2009 em diante), **Neotropikey - chaves interativas e recursos de informação para plantas de florescência do Neotropico**. [Http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Phytolaccaceae.htm](http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Phytolaccaceae.htm) .

VAARA,M.T. Polycations sensitize enteric bacterioto antibiotics. **Antimicrobial Agents Chemother.** v24, p.107–113, 1983.

VELÁZQUEZ-MEZA, M. E. *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. **Salud Pública de México**, v. 47, p. 381-7, 2005.

YARZA, Oscar. Plantas que curam e plantas que matam – anatomia, enfermidades, processos curativos vegetais, plantas narcóticas: um cientista das plantas e das ervas. São Paulo: **Hemus**, v. 2. 1982.

YI,S.M; ZHU,J.L; FU,L.L. Tea poly phenols inhibit *Pseudomonas aeruginosa* through damage to the cell membrane. **International Jornal Food Microbiology**. v144, p.111–117. 2010.

ZUZARTE, M. et al. Antifungal activity of phenolicrich *Lavandula multifida* L. essential oil. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, p. 1359-1366, 2012.

## CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DOS CASOS DE DENGUE NO MUNICÍPIO DE SOBRAL-CEARA, ENTRE O PERÍODO DE 2014 A 2017

Data de aceite: 01/10/2020

Data de submissão: 30/09/2020

### **Manoel Vieira do Nascimento Junior**

Universidade Federal do Ceará- UFC  
Sobral-CE  
<http://lattes.cnpq.br/0774098292037772>

### **José Jackson do Nascimento Costa**

Centro Universitário INTA - UNINTA  
Sobral-CE  
<http://lattes.cnpq.br/8813841001992268>

### **Maria Amélia Araújo Soares Costa**

Centro Universitário INTA - UNINTA  
Sobral-CE  
<http://lattes.cnpq.br/6875506563606447>

**RESUMO:** A dengue é uma doença infecciosa causada por um vírus de genoma RNA, do qual são reconhecidos quatro sorotipos, tendo o *Aedes aegypti* como principal vetor. A infecção por qualquer um destes sorotipos pode ser assintomática ou sintomática. As infecções sintomáticas podem cursar com doença febril indiferenciada até uma doença hemorrágica grave e fatal. No Nordeste, o Ceará é o terceiro estado com maior quantidade de casos de Dengue (2.359 casos). O objetivo desse estudo é identificar a ocorrência de casos de dengue notificados no município de Sobral - Ceará, no período de 2014 a 2017. Trata-se de uma pesquisa qualitativa, realizada por meio de um estudo epidemiológico retrospectivo entre os anos de 2014 a 2017, tomando como fonte de dados o Sistema de Informação de Agravos de

Notificação (SINAN). Entre os anos de 2014 e 2017 foram notificados 2867 casos de dengue no município de Sobral-Ceará, dos quais 59,33% ocorreram em indivíduos do sexo feminino. Destes, 1,52% ocorreram em gestantes entre o primeiro e terceiro trimestre gestacional. No tocante a faixa etária, 40,53% ocorreram em indivíduos entre 20 e 39. Quanto a classificação dos casos sintomáticos, 98,70% foram classificados como dengue, 0,41% como dengue com sinais de alarme, 0,17% como dengue grave e 0,03% como dengue clássica ou síndrome do choque do dengue. A maioria dos casos foram confirmados por exames laboratoriais (74,67%), sendo o exame sorológico IgM o mais utilizado. A maioria dos infectados (90,65%) não necessitou de hospitalização, com 90,37% evoluindo para cura. Conclui-se que durante o período estudado, os casos de dengue no município de Sobral-Ce, ocorreram principalmente na população feminina adulto jovem ou adulto, sendo um fato preocupante, já que estas mulheres se encontram na faixa etária economicamente e sexualmente ativa. Assim, suscita-se a necessidade de intensificar as campanhas de combate ao mosquito vetor.

**PALAVRAS - CHAVE:** Dengue. Epidemiologia. Sobral

### EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF DENGUE CASES IN THE MUNICIPALITY OF SOBRAL-CEARÁ, BETWEEN THE PERIOD 2014 TO 2017

**ABSTRACT:** Dengue is an infectious disease caused by an RNA genome virus, of which

four serotypes are recognized, with *Aedes aegypti* as the main vector. Infection with any of these serotypes can be asymptomatic or symptomatic. Symptomatic infections can go from undifferentiated febrile illness to severe and fatal hemorrhagic disease. In the Northeast, Ceará is the third state with the highest number of Dengue cases (2,359 cases). The objective of this study is to identify the occurrence of dengue cases notified in the municipality of Sobral - Ceará, in the period from 2014 to 2017. This is a qualitative research, carried out through a retrospective epidemiological study between the years 2014 to 2017, taking as a data source the Notifiable Diseases Information System (SINAN). Between 2014 and 2017, 2867 cases of dengue were reported in the municipality of Sobral-Ceará, of which 59.33% occurred in females. Of these, 1.52% occurred in pregnant women between the first and third trimester of pregnancy. Regarding the age group, 40.53% occurred in individuals between 20 and 39. As for the classification of symptomatic cases, 98.70% were classified as dengue, 0.41% as dengue with alarm signs, 0.17% as severe dengue and 0.03% as classic dengue or dengue shock syndrome. Most cases were confirmed by laboratory tests (74.67%), with the IgM serological test being the most used. Most of those infected (90.65%) did not require hospitalization, with 90.37% progressing to a cure. It is concluded that during the studied period, dengue cases in the municipality of Sobral-Ce, occurred mainly in the young adult or adult female population, being a worrying fact, since these women are in the economically and sexually active age group. Thus, there is a need to intensify campaigns to combat the vector mosquito.

**KEYWORDS:** Dengue. Epidemiology. Sobral

## INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença infecciosa causada por um vírus de genoma RNA, do qual são reconhecidos quatro sorotipos (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4), tendo o *Aedes aegypti* como principal vetor. A infecção por qualquer um dos quatro sorotipos virais da dengue pode ser assintomática ou sintomática. As infecções sintomáticas podem causar um amplo espectro clínico, que varia desde uma doença febril indiferenciada a uma doença hemorrágica grave e fatal. Com relação ao número de casos no Brasil, em 2019, a região Sudeste apresentou o maior número de casos prováveis de dengue (179.714 casos; 65,7%) em relação ao total do país, seguida das regiões Centro-Oeste (48.048 casos; 17,6%), Nordeste (20.543 casos; 7,5%) Norte (16.630 casos, 6,1%) e Sul (8.258 casos; 3,0%). No Nordeste, até o momento, neste mesmo período, o estado do Ceará é o terceiro estado com maior quantidade de casos de Dengue (2.359 casos), perdendo apenas para os estados da Bahia (8.785 casos) e do Pernambuco (4.014 casos).

## OBJETIVOS

Identificar a ocorrência de casos de dengue notificados no município de Sobral - Ceará, no período de 2014 a 2017.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa, de cunho quantitativo, foi realizada por meio de um estudo epidemiológico retrospectivo entre os anos de 2014 a 2017, tomando como fonte de dados o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Os resultados obtidos foram tabulados e organizados em planilhas utilizando o software Microsoft /Excel 2010. Os dados são de domínio público, portanto, não sendo necessária a aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa ou Comissão Científica Local de acordo com a Resolução nº 510 de 2016 do Conselho Nacional de Saúde.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os anos de 2014 e 2017 foram notificados 2867 casos de dengue no município de Sobral-Ceará, sendo a maior ocorrência no ano de 2015, com 54,86% (1573/2867) das ocorrências. Os dados disponíveis no SINAN mostram que os casos de dengue vêm aumentando nos últimos anos no Brasil, porém observa-se uma oscilação entre crescimento e decréscimo. Isso demonstra que a dengue não foi erradicada no país. As campanhas contra a dengue promovidas pelo governo sempre foram mais intensas nos momentos em que a incidência crescia muito, o que levava a redução dos casos. Mas depois os números cresciam novamente devido a diminuição dos esforços no combate do vetor. Segundo o sexo, foi possível observar que a maioria dos casos, 59,33% (1701/2867) ocorreram em indivíduos do sexo feminino. Destes, 1,52% (26/1701) ocorreram em gestantes entre o primeiro e terceiro trimestre gestacional. A infecção por dengue durante a gestação tem sido associada ao desenvolvimento de pré-eclâmpsia, eclâmpsia, hemorragia e óbitos maternos, mas não à ocorrência de malformações congênitas. No tocante a faixa etária, a maioria dos casos, 40,53% (1162/2867) ocorreram em indivíduos entre 20 e 39 anos, seguido daqueles que apresentavam idade entre 40 e 59 anos, 22,49% (645/2867) dos casos. Estes dados mostram que os indivíduos economicamente ativos (faixa etária entre 20 e 59 anos) foram mais acometidos pela doença o que pode ocasionar absenteísmo escolar ou ao trabalho levando a prejuízos econômicos, sociais, escolares, dentre outros. As infecções sintomáticas pelo vírus da dengue podem causar um amplo espectro clínico, que varia desde uma doença febril indiferenciada a uma doença hemorrágica grave e fatal. Desta forma, no que diz respeito a classificação dos casos sintomáticos de dengue notificados nesse estudo, 98,70% (2830/2867) foram classificados como dengue, contudo, 0,41% (12/2867) foram classificados como dengue com sinais de alarme, 0,17% (5/2867) como dengue grave e 0,03% (1/2867) como dengue clássica ou síndrome do choque do dengue. Com relação ao critério de confirmação dos casos de dengue, 74,67% (2141/2867) foram confirmados através de exames laboratoriais, já para confirmação de 16,07% (461/2867) dos casos utilizou-se apenas o critério clínico-epidemiológico. No tocante aos exames laboratoriais utilizados para confirmação dos casos de dengue, o mais realizado foi

o exame sorológico (IgM dengue), em 77,74% (2229/2867) dos casos. Do total de casos de dengue notificados, 72,65% (2083/2867) mostraram-se positivo através do uso deste teste. De fato, a literatura mostra que a captura de anticorpos da classe IgM por MAC Elisa é o método mais empregado para confirmação de casos suspeitos de dengue. A sorologia é o método de escolha quando a amostra de sangue é obtida a partir do final da fase aguda da doença. A pesquisa de anticorpos contra o vírus da dengue também permite verificar se a resposta imune do hospedeiro é primária ou secundária. No que diz respeito a ocorrência de hospitalização, em 90,65% (2599/2867) dos casos não ocorreu hospitalização. No tocante a evolução dos casos, 90,37% (2591/2867) evoluíram para a cura. Porém, vale ressaltar que segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), anualmente, ocorre cerca de 550 mil hospitalizações e 20 mil óbitos por infecção pelo vírus da dengue em todo o mundo.

## CONCLUSÃO

Deste modo, conclui-se que durante o período estudado, os casos de dengue no município de Sobral-Ce, ocorram principalmente na população feminina adulto jovem ou adulto. Isto é um fato preocupante uma vez que estas mulheres se encontram na faixa etária economicamente e sexualmente ativa. Além disso, estas mulheres estão expostas a contaminação por outros vírus que também são transmitidos pelo *A. aegypti*, tais como, Zika e Chikungunya, sendo estes associados a sequelas mais graves, tais como, dores crônicas nas articulações e hidrocefalia em bebês. Assim, ressalta-se que a melhor maneira de controlar o aumento de casos de dengue é combater os criadouros dos mosquitos, através de campanhas de eliminação de criadouros e conscientização da população das áreas afetadas e de risco.

## REFERÊNCIAS

BASTOS, W. B. **Prevalência sorológica de infecções por dengue, zika e chikungunya vírus em gestantes atendidas numa maternidade pública, no município de Nova Iguaçu, Baixada Fluminense**. Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, Rio de Janeiro, 2018. 58f.

BRASIL. Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e Zika) até a Semana Epidemiológica 12 de 2019 e Levantamento Rápido de Índices para *Aedes aegypti* (LIRAA). **Boletim epidemiológico**, Brasília, v.50, n.13, Abr. 2019. Disponível:< <https://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/abril/30/2019-013-Monitoramento-dos-casos-de-arboviroses-urbanas-transmitidas-pelo-Aedes-publicacao.pdf>.> Acesso em: 27 set. 2019.

LEITE, P. L. **Impacto da Dengue no Brasil em período epidêmico e não epidêmico: Incidência, Mortalidade, Custo hospitalar e Disability Adjusted Life Years (DALY)**. Dissertação (Mestrado) Mestrado em Medicina Tropical – Universidade de Brasília, 2015. 58p.



NASCIMENTO, L. B., SIQUEIRA, C. M., COELHO, G. E., JÚNIOR, J. B. S. Dengue em gestantes: caracterização dos casos no Brasil, 2007-2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. Brasília-DF. v.26. n. 3. p. 433-442, 2017.

# CAPÍTULO 6

## CONTAMINATION ASSESSMENT OF BIVALVE MOLLUSK INTENDED FOR HUMAN CONSUMPTION PRODUCED IN COASTAL WATERS OF NORTHERN BRAZIL

Data de aceite: 01/10/2020

Data de submissão: 12/08/2020

### **Daniela Cristiane da Cruz Rocha**

Evandro Chagas Institute, Section of Bacteriology and Micology, Laboratory of Bacterial Enteroinfections, Ananindeua, PA, Brasil  
<http://lattes.cnpq.br/4294679098531496>

### **Aline Holanda Sousa**

Evandro Chagas Institute, Section of Bacteriology and Micology, Laboratory of Bacterial Enteroinfections, Ananindeua, PA, Brasil  
<http://lattes.cnpq.br/6631292002735639>

### **Debora de Castro Costa**

Evandro Chagas Institute, Section of Bacteriology and Micology, Laboratory of Bacterial Enteroinfections, Ananindeua, PA, Brasil  
<http://lattes.cnpq.br/4130647351782773>

### **Karina Lúcia Silva da Silva**

Evandro Chagas Institute, Section of Bacteriology and Micology, Laboratory of Bacterial Enteroinfections, Ananindeua, PA, Brasil  
<http://lattes.cnpq.br/4308364152963260>

### **Anderson Nonato do Rosario Marinho**

Evandro Chagas Institute, Section of Bacteriology and Micology, Laboratory of Bacterial Enteroinfections, Ananindeua, PA, Brasil  
<http://lattes.cnpq.br/1184866913213283>

**ABSTRACT:** The northern coast of Brazil in the state of Pará is at second place in the national ranking of volume of fish and the production of bivalve mollusks. Outbreaks diarrhea associated with fresh consumption of mollusks is common around the world, but these data are scarce in Brazil. In the present work we carried out the research of bacteria (Enterobacteriaceae, Vibrionaceae and Aeromonadaceae) in bivalve mollusks produced on the north coast of Brazil in the State of Pará. The samples were obtained from five producing regions. The identifications were made by classical methods and by Multiplex PCR for diarrhea *E. coli* and monoplex PCR for *Vibrio*. All samples showed positive results for one or more agents, with a higher prevalence of *Escherichia coli* (100%), with atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC), present in two pools. *Klebsiella* was present in 42.8%. The Vibrionaceae family was identified in 57.1%, of these *Vibrio parahaemolyticus* with 42.8%, *Vibrio alginolyticus* with 42.8%, followed by *Vibrio fluvialis* with 28.6%. The Aeromonadaceae family was identified in 57.1% of the samples, of these *Aeromonas sobria* with 42.8%, followed by *Aeromonas salmonicida* 28.6%. The genotypic characterization of *Vibrio* corroborates the results of phenotypic analysis, with the *tlh* gene present in 100% of *Vibrio parahaemolyticus* isolates, as well as amplified *gyr B* in all isolates of *Vibrio alginolyticus*, the *cth* gene amplified in the *Vibrio vulnificus* isolate. The results obtained indicate that there is microbiological contamination of bivalve mollusks produced on the northern coast of Brazil, in the State of Pará. Evidencing the need for greater attention in the area of food security,

especially when it comes to bivalve mollusks.

**KEYWORDS:** Mollusks, Contamination, Vibrionaceae, Enterobacteriaceae, Aeromonadaceae.

## AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DE MOLUSCOS BIVALVES, DESTINADOS AO CONSUMO HUMANO, PRÓDUZIDOS EM ÁGUAS COSTEIRAS DO NORTE DO BRASIL

**RESUMO:** O litoral norte do Brasil no Estado do Pará ocupa o segundo lugar no *ranking* nacional de volume de pescado e na produção de moluscos bivalves. Os surtos diarreicos associados ao consumo *in natura* de moluscos são comuns ao redor do mundo, porém esses dados são escassos no Brasil. No presente trabalho realizamos a pesquisa de bactérias (Enterobacteriaceae, Vibrionaceae e Aeromonadaceae) em moluscos bivalves produzidos na costa norte do Brasil no Estado do Pará. As amostras foram obtidas de cinco regiões produtoras. As identificações foram por métodos clássicos e por PCR Multiplex para *E. coli* diarreio gênica e PCR monoplex para *Vibrio*. Todas as amostras apresentaram resultados positivos para um ou mais agente, com maior prevalência da *Escherichia coli* (100%), com *Escherichia coli* enteropatogênica atípica (aEPEC), presente em dois pools. *Klebsiella* esteve presente em 42,8%. A família Vibrionaceae foi identificada em 57,1%, destes *Vibrio parahaemolyticus* com 42,8%, *Vibrio alginolyticus* com 42,8%, seguido por *Vibrio fluvialis* com 28,6%. A família Aeromonadaceae foi identificada em 57,1% das amostras, destas *Aeromonas sobria* com 42,8%, seguida por *Aeromonas salmonicida* 28,6%. A caracterização genotípica de *Vibrio* corroboram com os resultados da análise fenotípica, com o gene *tlh* presente em 100% dos isolados de *Vibrio parahaemolyticus*, assim como *gyr B* amplificado em todos os isolados de *Vibrio alginolyticus*, o gene *cth* amplificado no isolado de *Vibrio vulnificus*. Os resultados obtidos indicam que há contaminação microbiológica de moluscos bivalves produzidos no litoral norte do Brasil, no Estado do Pará. Evidenciando a necessidade de maior atenção na área de segurança alimentar, principalmente quando se trata de moluscos bivalves.

**PALAVRAS - CHAVE:** Moluscos, Contaminação, Vibrionaceae, Enterobacteriaceae, Aeromonadaceae.

## 1 | INTRODUCTION

In several Brazilian coastal states, bivalve molluscs, such as mussels and oysters, guarantee the subsistence of part of the population linked to artisanal fishing in both terms of consumption and trade (Valle & Proença, 2000). The State of Pará ranks second in terms of the volume of fish landed, since extractive fishing is an important activity in the North of Brazil (Brasil, 2010).

Feldhusen (2000), described the existence of three groups of pathogenic bacteria, which are closely related to diseases caused by the consumption of marine products, including bivalve molluscs. The group of bacteria naturally present in the aquatic ecosystem (such as *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium botulinum*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* and *Listeria monocytogenes*), the group of bacteria in the environment as a result of contamination by animal feces (such as *Escherichia coli*, *Shigella*

spp. and *Salmonella* spp.) and the group of bacteria that arrive in these products during their handling and processing (such as *Staphylococcus aureus*).

In addition to the existence of fecal contamination indicators used in the quality analysis of bivalve molluscs, different species of the *Vibrio* genus occur naturally in marine, coastal and estuarine environments, with some species, such as *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* being pathogenic to the human, they can be found in undercooked or partially raw foods such as fish and shellfish (Thompson et al., 2004).

The importance of marine foods as a vehicle for foodborne diseases is conditioned by some factors, such as the diet of the consuming population, care after collecting mollusks and the traditional way of preparing food. Thus, due to the high consumption of fresh fish, Japan has a higher proportion of outbreaks when compared to countries such as the United States and Canada (Huss et al., 2000).

Although there are few references on the incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in intestinal infections (Magalhães et al., 1991) and skin infections (Rodrigues et al., 2001) in Brazil, the detection of *Vibrio parahaemolyticus* with potential for virulence of a pandemic clone from two outbreaks and several isolated cases of gastroenteritis in northeastern Brazil, highlighting the need for the development of routine tests to monitor diarrheal outbreaks and isolated cases (Leal et al., 2008), particularly in coastal areas and when there is a history of a patient who handled or consumed products of marine origin.

## 2 | MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Genotypic Characterization of *Escherichia coli*.

In the present study, multiplex PCR was used to detect diarrhogenic *Escherichia coli*. *Escherichia coli* was detected in the seven analyzed pools, of these, two Sample Pools 4 and 5 (28.6%) were positive for the *eae* gene that correspond to the atypical *Escherichia coli* (aEPEC), as shown in figure 1. The other genes researched were not detected in the analyzed isolates.

### 2.2 Processing Of Samples

The fresh samples were packed in properly identified plastic bags, stored under refrigeration and sent to the laboratory. Subsequently, they were washed individually with sterile distilled water and 70% alcohol under sterile conditions, in a laminar flow hood. To open the valves, knives and/or scalpels were used to remove the soft tissue, followed by grinding the tissue with the aid of grail and pistil. For bacteriological analyzes, between 25 and 75g of each pool were used.

### 2.3 Bacteriological Analysis

Isolation and biochemical characterization methods were used to identify enterobacteria. The 25 grams of the macerate were added in 225 ml of Buffered Peptone Water (BPW pH 7.0), homogenized and incubated at 35°C for 18 hours.

For the research of *Salmonella* an aliquot (0.1 mL) of the culture in BPW was inoculated in Rappaport-Vassiliadis (RV) broth and incubated at 42.2 °C for 18 hours. Another aliquot of the BPW (0.1 mL) was inoculated in EC broth and incubated at 35 °C for 18 hours, aiming at the isolation of *E. coli*. Subsequently, the cultures of the RV and EC broths were sown in selective and indicators media: SS agar and Mac Conkey agar, respectively. The suspected colonies of *Salmonella* and *Escherichia coli* were submitted to the Triple Sugar Sugar (TSI) culture medium and biochemically identified. For *Vibrio* research, 75g of the samples were diluted in APW 1% NaCl, APW 3% NaCl and BPW and subsequent isolation in SS, MC and TCBS media. About 5 to 10 suspicious colonies were sown in the TSI and Kligler screening media, followed by biochemical and serological identification.

## 2.4 Molecular Research Of Diarrheal *Escherichia Coli* And *Vibrio Sp*

The samples of *Escherichia coli* previously biochemically identified were grown on nutrient agar (Difco) at a temperature of 35–37 °C for 18–24 hours. The DNA of the isolates phenotypically characterized as *Escherichia coli* were extracted by the DNA IQ kit (Promega) following the manufacturer’s recommendations. Subsequently, the samples were amplified by PCR Multiplex, using the primers described by Aranda et al. (2007) (Table 1).

Primers	Primers Sequence (5'- 3')	Amplicon pb	Target gene	Reference
eae-1 eae-2	CTGAACGGCGATTACGCGAA CGAGACGATACGATCCAG	917	<i>eae</i>	Aranda et al. (2004)
BFP-1 BFP-2	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	326	<i>bfpA</i>	Aranda et al. (2004)
aggRks-1 aggRksa-2	GTATACACAAAAGAAGGAAGC ACAGAATCGTCAGCATCAGC	254	<i>aggR</i>	Toma et al. (2003)
LT-f LT-r	GGCGACAGATTATACCGTGC CGGTCTCTATATTCCTGTT	450	<i>elt</i>	Aranda et al. (2004)
ST-f ST-r	ATTTTTMTTCTGATTRTCTT CACCCGGTACARGCAGGATT	190	<i>est</i>	Aranda et al. (2004)
IpaH-1 IpaH-2	GTTCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC GCCGGTCAGCCACCCCTTGAGAGTAC	600	<i>ipaH</i>	Aranda et al. (2004)
VTcom-u VTcom-d	GAGCGAAATAATTTATATGTG TGATGATGGCAATTCAGTAT	518	<i>stx1/stx2</i>	Toma et al. (2003)

Table 1: *Primers* that were used in multiplex PCR of diarrheal *E. coli* and their respective amplification products.

The Multiplex PCR reaction was performed from 2 µL of each extracted DNA and 23 µL of the mix solution, containing between 0.5 to 1.5 µL according to each primer (Invitrogen,

Brazil), 10 mM dNTP mix dATP , dCTP, dGTP, dTTP (Invitrogen, Brazil Invitrogen, USA), 0.5 U of Taq DNA polymerase platinum, Taq 1X buffer, 50 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, Brazil) and ultra-pure sterile water for a final volume of 25  $\mu$ L. The multiplex PCR reactions were incubated in a Veriti™ 96-Well Thermal Cycler gradient thermocycler (Applied Biosystems – USA), with the program with the specific amplification cycles that consisted of 1 step of 2 min at 50 °C (Hot-Start ), 1 step of 5 min. at 95°C (initial denaturation) followed by 40 cycles of 1 s at 95°C, 50°C and 72°C and 1 7 min extension final step at 72°C. The amplicons were analyzed by electrophoresis on 2% agarose gel and visualized under UV light with the help of a transilluminator (Vilber Lourmat, France).

The genotypic confirmation of *Vibrios* was performed by PCR by detecting the *tdh* (*thermostable direct hemolysin*) and *trh* (*thermostable direct hemolysin-related hemolysin*) genes, in addition to the search for the *tli* (*thermolabile hemolysin*) gene, which is a species-specific marker for *Vibrio parahaemolyticus* and *gyr B* for *Vibrio alginolyticus* and *cth* for *Vibrio vulnificus* (Table 2). The amplifications were made in a thermocycler, programmed for 30 cycles of 1 minute at 94 °C, 60 °C and 2 minutes at 72 °C, a final stage of 3 minutes at 72 °C.

Primers	Primers Sequence (5'-3')	Amplicon pb	Target gene
<i>tdh</i>	GTAAGGTCTCTGACTTTTGGAC TGGAATAGAACCTTCATCTTCACC	269 pb	<i>tdh</i>
<i>trh</i>	TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT CATAACAAACATATGCCCATTTCCG	450 pb	<i>trh</i>
<i>tli</i>	AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG GCTACTTTCTAGCATTCTCTGC	450 pb	<i>tli</i>
<i>cth</i>	CGAATCCTTGAACATACGCAGC CGCCGCTCACTGGGGCAGTGGCTG	386 pb	<i>cth</i>
<i>gyr B</i>	GAGAACCCGACAGAAGCGAAG CCTAGTGCGGTGATCAGTGTTG	337 pb	<i>gyr B</i>

Table 2: *Primers* that were used in genotypic identification using the *Vibrio* sp PCR technique.

## 3 | RESULTS

### 3.1 Analysis Of Surveyed Bacteria

All samples analyzed in the present study showed positive results for one or more agents, with a higher prevalence of *Escherichia coli*, present in the seven pools analyzed, as described in table 3.

SAMPLE *	FAMILY			ORIGIN
	Enterobacteriaceae	Vibrionaceae	Aeromonadaceae	
Sample Pool 1	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Klebsiella</i> <i>spp</i> ; <i>Edwardsiella tarda</i> ; <i>Morganella morganii</i> .	<i>Vibrio fluvialis</i>	<i>Aeromonas sóbria</i> ; <i>Aeromonas</i> <i>hydrophila</i>	Maracanã
Sample Pool 2	<i>Escherichia coli</i> .			Salinópolis
Sample Pool 3	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Morganella</i> <i>morganii</i> ; <i>Edwardsiella tarda</i> .	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ; <i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Aeromonas sobria</i>	Curuçá
Sample Pool 4	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Enterobacter spp</i> ; <i>Klebsiella spp</i> ; <i>Proteus mirabilis</i> .	<i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i> ; <i>Vibrio</i> <i>alginolyticus</i> ; <i>Vibrio</i> <i>fluvialis</i> ; <i>Vibrio</i> <i>Cholerae</i>	<i>Aeromonas</i> <i>salmonicida</i> ; <i>Aeromonas sobria</i>	São Caetano de Odivelas
Sample Pool 5	<i>Escherichia coli</i>	<i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i> ; <i>Vibrio alginolyticus</i> ; <i>Vibrio vulnificus</i>	<i>Aeromonas</i> <i>salmonicida</i>	São Caetano de Odivelas
Sample Pool 6	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Klebsiella spp</i> .			Salinópolis
Sample Pool 7	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Klebsiella spp</i> ; <i>Citrobacter spp</i> ;			Primavera

Table 3: Results of laboratory analysis to detect bacteria belonging to the Enterobacteriaceae, Vibrionaceae and Aeromonadaceae families in the samples of bivalve molluscs.

\* Samples 1 to 3 made up of oysters, samples 4 to 7 made up of mussels.

### 3.2 Genotypic Characterization Of *Escherichia Coli*.

In the present study, multiplex PCR was used to detect diarrhogenic *Escherichia coli*. *Escherichia coli* was detected in the seven analyzed pools, of these, two Sample Pools 4 and 5 (28.6%) were positive for the *eae* and *bfpA* genes that correspond to the atypical *Escherichia coli* (aEPEC), as shown in figure 1. The other genes researched were not detected in the analyzed isolates.

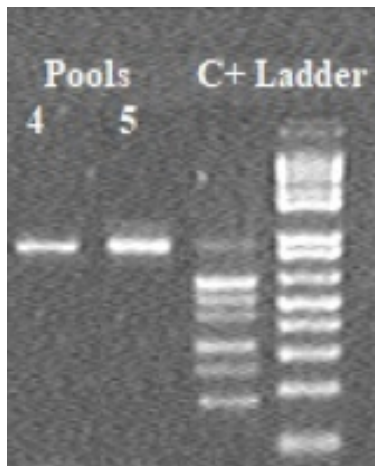


FIGURE 1: Visualization of the amplified product in a 2% agarose gel, confirming the presence of the atypical *Escherichia coli* (aEPEC) *eae* gene (917 bp). DNA Ladder (L) 1Kb.

### 3.3 Genotypic Characterization Of Vibrios

Of the seven Pools analyzed, three (42.8%) were positive for species-specific *Vibrio* genes (*tlh*- *Vibrio parahaemolyticus* gene; *gyr B*- *Vibrio alginolyticus* and *cth*- *Vibrio vulnificus* gene) (Figure 2).

In researching the five genes (*tdh*, *trh*, *tlh*, *cth* e *gyr B*), it was observed that the *tlh* and *gyr B* genes were amplified in sample pools 4 and 3, in sample pool 5 in addition to the amplification of the *tlh* and *gyr B* genes, the *cth* gene was identified. The remaining genes *tdh* and *trh*, were not detected in any of the analyzed pools.

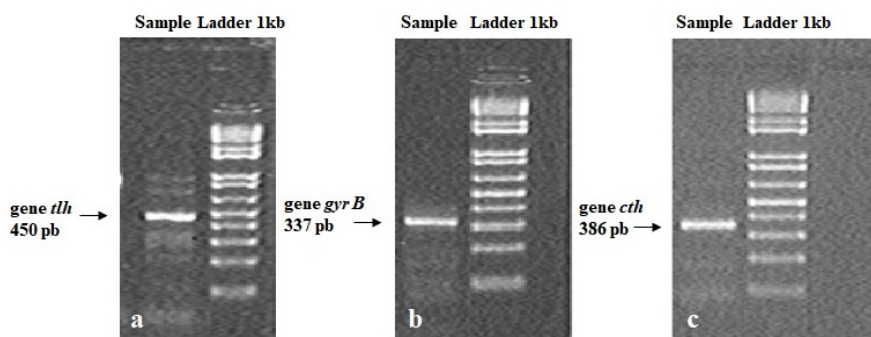


Figure 2: Visualization of the product amplified in agarose gel at 2%, in a) *tlh* gene (450 pb), b) *gyr B* gene (337 pb) and in c) *cth* gene (386 pb), DNA Ladder (L) 1Kb.



## 4 | DISCUSSION

Of the seven samples analyzed, 100% showed contamination by one or more species of bacteria from the Enterobacteriaceae family. The species most frequently isolated was *Escherichia coli*, present in the seven samples analyzed (100%), followed by *Klebsiella*, present in three samples (42.8%). Some species of *Escherichia coli* are pathogenic, such as atypical *Escherichia coli* (aEPEC), isolated in the present study (Sample Pools 4 and 5). Similar data were found in northeastern Brazil where samples of mussels obtained in the Vaza Barris estuary in Sergipe showed pathogenic strains of *Escherichia coli* (EPEC and EIEC) (Farias, Trindade & Alcântara (2010), demonstrating that the contamination can extend for the Atlantic coast from the north of the Brazilian Amazon to the northeast of the country.

Diarrhea cases associated with the consumption of bivalve molluscs are reported worldwide (Westrell et al., 2010; Fong & Lipp 2005), however, the findings of atypical *Escherichia coli* (aEPEC) of the present study in samples of bivalve molluscs for human consumption, may trigger, in addition to diarrhea, other disorders such as hemorrhagic colitis, meningitis, uremic syndrome and septicemia (Jafari et al., 2012) emphasizing the need for greater control in the production of these animals in northern Brazil.

In the analysis of Vibrionaceae family bacteria, four (57.1%) of the samples showed contamination by potentially pathogenic vibrio species (sample pool 1, 3, 4 and 5), such as *Vibrio parahaemolyticus* present in three (42.8%) of the samples (sample pool 3, 4 and 5). With this pathogen, according to García-Lázaro et al. (2010), having been responsible for outbreaks of diarrhea worldwide, being related to up to 20% of cases of acute dysentery in underdeveloped countries, such as those observed in northern Brazil, and to 24% of food poisoning in Japan. The contamination observed in the present study reflects what occurs in other countries in America and Asia, with raw oysters consumed as the main transmission vehicles not only of *Vibrio parahaemolyticus*, but also of *Vibrio alginolyticus*, which were the most isolated species, being present in 3 (42.8%) of the samples (sample pool 3, 4 and 5), followed by *Vibrio fluvialis*, present in two (28.6%) of the samples (sample pool 1 and 4) that are also associated with diarrhea cases (Thompson et al., 2004, García-Lázaro et al. (2010).

For the Aeromonadaceae family, four (57.1%) of the samples (sample pool 1, 3, 4 and 5) presented contamination, where the species *Aeromonas sobria* was the most isolated, present in three (42.8%) of the samples (pool of samples 1, 3 and 4), followed by *Aeromonas salmonicida*, in two samples (pool of samples 4 and 5) (28.6%), the percentage of mollusk contamination by *Aeromonas* spp found in the present work was similar to those observed by Evangelista-Barreto et al., 2006, who isolated samples of *Aeromonas* spp in 50% of the analyzed molluscs, unlike the findings by Melo Silva et al (2014) who detected *Aeromonas* spp in 98.3% of its isolates. Such percentage difference in the analyzed samples and the literature may be due to the fact that the estuaries in the north of the Brazilian

Amazon suffer the action of rain and tides. Which, depending on the time of year, would lead to a concentration or dilution of particles of pathogens in the water, which would affect the contamination due to the molluscs being filters (Carver & Mallet 1990; Pereira et al., 2007; Marinho et al 2018).

The *tlh*, *cth* and *gyr B* genes are species-specific markers for vibrio confirmation, where the results of the genotypic characterization corroborate with the results of the phenotypic analysis, the *tlh* gene was present in 100% of *Vibrio parahaemolyticus* isolates, as well as the *gyr B* gene was amplified in all *Vibrio alginolyticus* isolates, the *cth* gene was also amplified in *Vibrio vulnificus* isolate. Regarding the presence of virulence genes in *Vibrio parahaemolyticus*, the *tdh* and *trh* genes were not found in any of the analyzed samples. These findings are similar to those of Rojas (2011), who identified the *tdh* gene in two (10.5%) of the isolates analyzed, while the *trh* gene was not identified, a result similar to that of other studies. (Nishibuchi e Kaper, 1995; Bates e Oliver, 2004).

## 5 | CONCLUSION

The results obtained in the present study indicate the existence of microbiological contamination of bivalve molluscs produced in northern Brazil (State of Pará). It was observed that several microorganisms are presented as a potential risk to the population's health. The contamination found either by the lack of basic sanitation in the region and/or sanitary hygienic failures during the processing of the samples, shows the need for greater attention in the area of food safety, especially when it comes to bivalve molluscs, as a way to prevent the food outbreaks occurrence.

## REFERENCES

ARANDA, K.R.S., NETO, U.F., SCALETSKY, I.C.A. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, **42**: 5849-5853, 2004.

ARANDA, K.R.S., FABBRICOTTI, S.H., NETO, U.F., SCALETSKY, I.C.A. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. **Federation of European Microbiological Societies**, **267**: 145-150, 2007.

BATES T. C; OLIVER, J. D. The viable but nonculturable state of Kanagawa positive and negative strains of *Vibrio parahaemolyticus*. **J. Microbiol.** 2004.

BRASIL, Ministério da Pesca e Aquicultura. Estatística da aquicultura e pesca no Brasil. 2010. Disponível em <<http://www.mpa.gov.br/#imprensa/2010/AGOSTO/>>.

CARVER, C. E. A. & MALLET, A. L. Estimating carrying capacity of a coastal inlet for mussel culture. **Aquaculture**, **8**: 39–53, 1990.

EVANGELISTA-BARRETO N. S, et al. *Aeromonas* spp. Isolated from oysters (Crassostrearhizophorea) from a natural oyster bed, Ceará, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop**, **48 (3)**: 129-133, 2006.

FARIAS, K. L.; TRINDADE, R. C.; ALCÂNTARA, A. V. Ocorrência de *Escherichia coli* (EPEC e EIEC) no sururu, *Mytella guayaniensis* Lamarck, e na água do estuário do Rio Vaza Barris (Sergipe, Brasil). **Arq. Ciên. Mar. Fortaleza**, 66-70, 2010.

FELDHUSEN, F. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. **Microbes and Infection**, **2**: 1651-1660, 2000.

FONG, T. & LIPP, E. K. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. **Microbiol. Mol. Biol. Rev**, **69**: 357–371, 2005.

GARCÍA-LÁZARO, M. et al. Cólera y otras infecciones del género *Vibrio*. **Medicine**, **10(52)**: 3489-96, 2010.

HUSS, H.H; REILLY, A; EMBAREK, P.K.B. Prevention and control of hazards in seafood. **Food Control**,**11**: 149-156, 2000.

JAFARI, A; ASLANI, M. M; BOUZARI, S. *Escherichia coli*: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. **Iran J Microbiol**, **102**: 117, 2012.

LEAL, N.C. et al. *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 gastroenteritis in northeast Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, **105(3)**: 691-697, 2008.

MAGALHÃES, V. et al. Gastroenterites humanas associadas a *Vibrio parahaemolyticus* no Recife, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **33(1)**: 64-68, 1991.

MARINHO, A.N.R. et al. Rotavirus analyses by SYBR Green real-time PCR and microbiological contamination in bivalves cultivated in coastal water of Amazonian Brazil. **Journal of Water and Health**, **16**: 970-979, 2018.

MELO SILVA, A.C.M et al, Caracterização de *Aeromonas spp* isoladas de amostras de ostras e água por método microbiológico e molecular. **Cienc. anim. bras., Goiânia**, **15**: 362-368, 2014.

NISHIBUCHI, M; KAPER, J. B. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. **Infect Immun**. 1995.

PEREIRA, C. S., POSSAS, C. A., VIANA, C. M. & RODRIGUES, D. P. *Vibrio* spp. isolados a partir de mexilhões (Perna perna) in natura e pré-cozidos de Estação Experimental de Cultivo, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, **27**: 387–390, 2007.

RODRIGUES, S.M.A. et al. Pesquisa de bactérias do gênero *Vibrio* em feridas cutâneas de pescadores do município de Raposa-MA. **Revta Soc. Bras. Med. Trop**, **34**: 407-411, 2001.

ROJAS, M. V. R. et al. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters and mussels in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop**, **53**: 4, 2011.

SILVA, A. C. M. M. et al. Caracterização de *Aeromonas spp* isoladas de amostras de ostras e água por

método microbiológico e molecular. **Ciência Animal Brasileira**, 15: n.3, 2014.

THOMPSON, F.L., LIDA, T., SWING, J. Biodiversity of vibrios. **Microbiol Mol Biol Rev**, 68: 403–431, 2004.

TOMA, C. et al. Multiplex PCR Assay for Identification of Human Diarrheagenic. *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, 3: 2669-2671, 2003.

VALLE, R.P., PROENÇA, C.E.M. Evolução e perspectivas da aquicultura no Brasil. In: VALENTI, W.C (Ed). **Aquicultura no Brasil. Brasília: CNPq/Ministério da Ciência e Tecnologia**, 383 – 398, 2000.

WESTRELL, T. Et al. Norovirus outbreaks linked to oyster consumption in the United Kingdom, Norway, France, Sweden and Denmark. **Euro Surveill**, 15: 8–11, 2010.

# CAPÍTULO 7

## FATORES RELACIONADOS AS INFECÇÕES HOSPITALARES POR BACTÉRIAS: UMA REVISÃO NARRATIVA

Data de aceite: 01/10/2020

### Érica Cristina Soares e Silva

Departamento de Biologia, Universidade Federal do Piauí  
Teresina – Piauí

### Antônio Rosa de Sousa Neto

Departamento de Enfermagem, Universidade Federal do Piauí  
Teresina – Piauí

### Daniella Farias Almeida

Departamento de Enfermagem, Universidade Federal do Piauí  
Teresina – Piauí

### Mayara Macêdo Melo

Programa de Pós-Graduação em Enfermagem; Universidade Federal do Piauí  
Teresina – Piauí

### Marly Marques Rêgo Neta

Programa de Pós-Graduação em Enfermagem; Universidade Federal do Piauí  
Teresina – Piauí

### Rosângela Nunes Almeida

Programa de Pós-Graduação em Enfermagem; Universidade Federal do Piauí  
Teresina – Piauí

### Inara Viviane de Oliveira Sena

Programa de Pós-Graduação em Enfermagem; Universidade Federal do Piauí  
Teresina – Piauí

### Daniela Reis Joaquim Freitas

Programa de Pós-Graduação em Enfermagem; Departamento de Parasitologia e Microbiologia, Universidade Federal do Piauí  
Teresina – Piauí

**RESUMO:** Hospitais são locais que se encontram pessoas com a saúde debilitada, constituindo um local de fácil disseminação de micro-organismos potencialmente patógenos e favorecendo a ocorrência de infecções relacionadas a assistência à saúde (IRAS). Essas Infecções ocorrem por diversos motivos, micro-organismos podem permanecer viáveis em superfícies inanimadas por dias, semanas e até meses, constituindo uma fonte de disseminação destes micro-organismos, através de profissionais da saúde que atuam direta ou indiretamente como vetores para pacientes mais vulneráveis, principalmente os que estão em Unidades de Terapia Intensiva. As principais bactérias associadas a infecções hospitalares são *Escherichia coli*, *Proteus* sp., *Serratia marcescens*, *Enterobacter* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas* sp., *Burkholderia* sp. e *Acinetobacter* sp., *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA), *Staphylococcus coagulase negativa*, e *Enterococcus*. Entre os fungos estão os gêneros *Candida* sp., *Aspergillus* sp., *Pneumocystis* sp. e *Cryptococcus* sp. No contexto hospitalar a disseminação de micro-organismos resistentes está diretamente ligada a pressão seletiva devido ao uso exacerbado de agentes antimicrobianos, a disseminação desses fenótipos através do ambiente e do contato de

profissionais da saúde com pacientes; somado a isso, a vulnerabilidade dos pacientes. Assim a prevenção das IRAS ainda tem se mostrado um desafio para os profissionais da saúde, problemas antigos de higiene ainda persistem, os esforços devem ocorrer para o desenvolvimento de novas estratégias e iniciativas, para a melhoria da qualidade assistencial e segurança do paciente.

**PALAVRAS - CHAVE:** Infecção hospitalar; Superfícies contaminadas; Resistência microbiana.

## FACTORS RELATED TO HOSPITAL INFECTIONS BY BACTERIA: A NARRATIVE REVIEW

**ABSTRACT:** Hospitals are places where people with poor health are found, constituting a place of easy dissemination of potentially pathogenic microorganisms and favoring the occurrence of healthcare-related infections (HAIs). These infections occur for several reasons, microorganisms can remain viable on inanimate surfaces for days, weeks, and even months, constituting a source of dissemination of these microorganisms, through health professionals who act directly or indirectly as vectors for the most vulnerable patients, especially those who are in Intensive Care Units. The main bacteria associated with hospital infections are *Escherichia coli*, *Proteus sp.*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas sp.*, *Burkholderia sp.* and *Acinetobacter sp.*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), coagulase-negative *Staphylococcus*, and *Enterococcus*. Among the fungi are the genera *Candida sp.*, *Aspergillus sp.*, *Pneumocystis sp.*, and *Cryptococcus sp.* In the hospital context, the spread of resistant microorganisms is directly linked to selective pressure due to the exacerbated use of antimicrobial agents, the dissemination of these phenotypes through the environment, and the contact of health professionals with patients; added to this, the vulnerability of patients. Thus, the prevention of HAIs has still proved to be a challenge for health professionals, old hygiene problems persist, efforts must be made to develop new strategies and initiatives, to improve the quality of care and patient safety.

**KEYWORDS:** Hospital infection; Contaminated surfaces; Microbial resistance.

## INTRODUÇÃO

Nos hospitais frequentemente estão presentes pessoas com a saúde debilitada, principalmente nas áreas críticas, fato preocupante pois nas suas superfícies podem ser encontrado diversos micro-organismos potencialmente patógenos como bactérias multirresistentes, favorecendo a ocorrência de infecções relacionada a assistência à saúde. (DRESCH et al., 2018).

Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) são àquelas adquiridas durante a prestação dos cuidados de saúde, após admissão do paciente, durante a internação ou após a alta (OLIVEIRA; SILVA; GARBACCIO, 2012). Atualmente as infecções hospitalares são consideradas um grande problema de saúde no Brasil, principalmente em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), cujo risco de infecções é elevado (MOURA et al., 2018). Representando um crescente problema, principalmente devido a potencial elevado

de causar mortalidade nos pacientes e pelos altos custos na assistência aos contaminados (CORREAL et al., 2013).

A transmissão de micro-organismos pode ocorrer através dos próprios profissionais de saúde, que podem atuar como vetores ao não seguir os protocolos, como exemplo a não higienização das mãos principalmente antes da prestação da assistência (FÉLIX; MIYADAHIRA, 2009). Outra forma, é devido a não realização da desinfecção e esterilização de superfícies e materiais utilizados; pois vários micro-organismos podem sobreviver e permanecer viáveis nestes locais ou objetos por tempo indeterminado (FERREIRA et al., 2011a).

Neste sentido, faz-se importante discutir conforme a literatura científica, quais são os locais onde ocorrem as maiores taxas de infecção, as principais bactérias presentes nas superfícies hospitalares, a ocorrência de resistência, as manifestações clínicas causadas nos paciente infectados, afim de propor medidas de controle e saneamento que podem servir para a diminuição dos índices de infecção.

## CONTAMINAÇÃO DE SUPERFÍCIES

Considerando a parcela de responsabilidade relacionada aos padrões de higiene e desinfecção no ambiente hospitalar sobre a incidência de infecções, a participação do ambiente pode ser ainda maior nas UTI, devido principalmente à gravidade e instabilidade do estado clínico do paciente que necessita de cuidados intensivos, somados a fatores como limpeza, desinfecção, estrutura física, quantidades de equipamentos e superfícies em determinadas unidades (HUANG; DATTA; PLAT, 2006). Estudos demonstraram que a maior incidência de contaminação está nas superfícies que onde há maior contato por parte de profissionais da saúde, como às grades de camas, torneiras, teclados, monitores e maçanetas; servido estas como fontes diretas de contaminação (DRESCH et al., 2018).

Dispositivos como cateteres sanguíneos e cateteres urinários também podem funcionar como fontes (MARCHAIM; KAYE, 2017; KALIL, et.al 2016). Devido a isso, as maiores taxas de IRAS são observadas em pacientes idosos e pacientes com o sistema imunológico comprometido, frequentemente internados e que necessitam de diversos procedimentos no ambiente hospitalar (DRESCH et al., 2018; FERNANDES, 2000; MIRZAIL et al., 2012).

Em sua maioria as infecções adquiridas em hospitais são causadas por bactérias Gram-negativas. Aquelas de maior relevância clínica e epidemiológica em ambientes hospitalares são as enterobactérias como *Escherichia coli*, *Proteus* sp., *Serratia marcescens*, *Enterobacter* sp. e *Klebsiella pneumoniae* e os não-fermentadores de glicose como *Pseudomonas* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Burkholderia* sp. e *Acinetobacter* sp (GARCIA et al., 2018; COELHO; MORAES; MONTEIRO, 2010). A contaminação do ambiente hospitalar também pode ocorrer por bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* resistente

a metilina (MRSA) e *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE) (GARCIA et al., 2018). Alguns dos principais micro-organismos associados a infecções hospitalares, assim como, as suas manifestações clínicas podem ser observados na tabela 1.

Micro-organismo	Onde é encontrado	Manifestações clínicas
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	Pele e mucosas	Infecções de pele e quadro de sepse.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Nasofaringe, pele e raramente na vagina.	Infecções cutâneas, pneumonia, endocardite e osteomielite.
<i>Escherichia coli</i>	Intestino	Diarreia de várias intensidades e infecções do trato urinário
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Fezes, água, solo, vegetais, cereais e frutas.	Pneumonia, infecções sanguíneas e do trato urinário.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Axilas e em áreas anogenitais da pele normal. Em hospitais, é encontrada frequentemente em pias, soluções antissépticas e receptáculos de urina.	Infecções cutâneas, do trato respiratório e bacteremia.
<i>Enterobacter spp</i>	trato gastrointestinal	Diarreia de várias intensidades
<i>Enterococcus faecalis</i>	trato gastrointestinal	Endocardite, infecção do trato urinário (ITU), prostatite.

Tabela 1. Principais micro-organismos presentes em superfícies hospitalares.

Fonte: Os autores 2020.

## MICRO-ORGANISMOS MAIS COMUNS EM INFECÇÃO DE AMBIENTES HOSPITALARES

Bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. são comumente encontradas em ambientes hospitalares. Embora, entre elas *S. aureus* ainda seja a espécie de maior relevância clínica; *Staphylococcus coagulase* negativa vem emergindo como um patógeno hospitalar comum em áreas críticas, com espécimes multirresistentes já identificados; fato que demonstra a necessidade de atenção a esta bactéria, principalmente devido a sua capacidade de causar infecções quanto pela sua capacidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos (FERREIRA et al., 2011b; MORAES et al., 2013).

Dentre as bactérias que apresentam importantes mecanismos de resistência a antimicrobianos podem-se destacar bacilos Gram negativos pertencentes à família Enterobacteriaceae, como é o caso de *Klebsiella pneumoniae* (ZANOL; CANTARELLI, 2016; QUEENAN; BUSH, 2007). Esta bactéria em questão, pode produzir a enzima



carbapenemase, que possui como nome *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC), mecanismo que pode estar presente também outras bactérias gram-negativas e que confere resistência aos anti-microbianos carbapenêmicos, além de inativar penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos, dificultando a escolha dos antimicrobianos em infecções graves e conseqüentemente elevando as taxas de mortalidade (GARCIA et al., 2019).

As Bactérias do gênero *Enterococcus* sp. também merecerem atenção, devido a capacidade sobreviver por longos períodos em diversas superfícies e solos, dentro de esgotos e hospitais, crescendo a temperaturas entre 10-45°C de ambientes básicos ou ácidos, isotônicos ou hipertônicos, manifestando alta resistência às drogas, como a vancomicina, penicilina, gentamicina, tetraciclina, eritromicina e teicoplanina (GARCIA et al., 2019; RODRIGUES et al., 2012). A *Pseudomonas aeruginosa* também pode estar presente na água e colonizar torneiras e tubulações, formando biofilme e assim favorecendo a persistência naqueles locais e tornando a água potencialmente contaminada, sendo um risco caso seja ingerida por pessoas debilitadas (DAMASCENO, 2010). O aspecto morfológico detectado por microscopia de varredura e colorido artificialmente destes micro-organismos pode ser visto na Figura 1.



Figura 1. Micro-organismos encontrados no ambiente hospitalar.

Fonte: Os Autores.

## RESISTÊNCIA MICROBIANA

Na medicina no século XX a terapia antibiótica foi um avanço essencial no tratamento de doenças infecciosas. Alexander Fleming descobriu o primeiro antibiótico biológico, a penicilina, e junto a isso já tinha ciência de que a resistência a esse medicamento estaria agregada ao seu uso sendo por isso necessário acompanhá-lo (DELLALIBERA-JOVILIANO; DE MELO; CENI, 2020). Os antimicrobianos reduziram a taxa de morbidade e mortalidade global causada por infecções bacterianas, pois esses fármacos são eficientes no tratamento bactericida. Porém, nas últimas décadas, os casos de resistência microbiana a antibióticos têm aumentado bastante, alertando os profissionais de saúde e a comunidade científica (MACEDO JUNIOR, 2019).

A resistência microbiana a antibióticos não se tornou um problema sério de saúde apenas pelo seu uso indiscriminado e intensivo nos últimos anos, mas também pelo longo processo de desenvolvimento de novos antibióticos (ROSA, 2015). Sabe-se que a transmissão do mecanismo de resistência pode ocorrer de diversas formas, seja de modo intrínseco ou adquirido, através de ganhos de funções variadas, pela produção de novas proteínas que inativam, mecanismos enzimáticos que alteram os fármacos, alvos terapêuticos alterados, bombas de efluxo aumentadas e modificações na permeabilidade da membrana (DELLALIBERA-JOVILIANO; DE MELO; CENI, 2020).

Tendo conhecimento que o aparecimento de resistência a antibióticos é um fenômeno natural que ocorre em micro-organismos, esse fato é exacerbado principalmente pelo uso inadequado de antimicrobianos, má qualidade dos medicamentos, falta de programas ou deficiência na prevenção e controle de infecções, baixa capacidade dos laboratórios em detectar a resistência, vigilância inadequada e regulação insuficiente do uso de antimicrobianos (FARIÑA, 2016). No contexto hospitalar essa rápida emergência e disseminação de micro-organismos resistentes é um problema de grande proporção e as causas são diversas, as razões principais são claras: estão altamente correlacionadas com a pressão seletiva devido ao uso inadequado de antimicrobianos e a disseminação destes fenótipos, que é facilitada pela transmissão pessoa-a-pessoa devido à aplicação inconsistente de práticas básicas de prevenção e controle de infecções pelos profissionais de saúde (DYAR; PAGANI; PULCINI, 2015).

Consciente do problema de resistência bacteriana o Brasil vem monitorando, desde 2013, e gerando boletins informativos de segurança do paciente e qualidade em serviços de saúde (DELLALIBERA-JOVILIANO; DE MELO; CENI, 2020). O primeiro relatório da Rede Nacional de Monitoramento de Resistência englobou dados de 26 das 27 unidades federativas do Brasil, com dados de fenótipos de resistência de 19.009 micro-organismos responsáveis por causarem Infecção primária da corrente sanguínea laboratorial IPCSL em UTI brasileiras, com essa informação confirmou-se que a resistência bacteriana é um problema de saúde pública em todo país (DELLALIBERA-JOVILIANO; DE MELO; CENI,

2020).

Segundo Caraça et al. (2016), o *Staphylococcus aureus* tem elevada repetição nas comunidades e nos hospitais e possui uma alta patogenicidade em causar doenças. As cepas de *S. aureus* resistente à metilina (MRSA), e a diversos antibióticos, têm aumentado o número de infecções hospitalares. O surgimento de uma infecção bacteriana resistente reduz as opções de fármacos efetivos no tratamento, agravando o quadro clínico do paciente já hospitalizado, aumentando o seu tempo de internação o que eleva os custos direcionados a sua recuperação, além de ele ficar exposto a outros tipos de complicações hospitalares (COSTA; SILVA JÚNIOR, 2017).

## PREVENÇÃO E CONTROLE DE INFECÇÕES

Com o intuito de erradicar as altas taxas de colonização e infecção nosocomial por bactérias resistentes, vários fatores devem ser levados em conta que estão diretamente ligados a essa ação, como tempo prolongada de internação do paciente, falta de mais profissionais da saúde na equipe para reduzir excesso de trabalho dos enfermeiros, a quantidade exata de enfermeiros por ala hospitalar, responsáveis por diminuir concomitantemente os riscos para desenvolvimento de infecções nosocomiais (AYCAN et al., 2015), além de medidas sanitárias de controle desses micro-organismos.

Embora tenha havido avanços no controle e prevenção das IRAS, incluindo a adoção de práticas de segurança, elas ainda são consideradas um grande desafio para os profissionais de saúde (MIRANDA, 2017). Se por um lado observa-se o desenvolvimento científico-tecnológico nas ações de saúde, por outro, tem-se observado que problemas antigos problemas ainda persistem, como é o caso destas infecções (OLIVEIRA; MARUYAMA, 2008). Isso ainda ocorre principalmente devido a não realização de medidas simples de que impedem a transmissão de bactérias e outros patógenos, tendo como exemplo a higienização das mãos (HESELTINE, 2001).

Além disso, faz-se importante considerar que o surgimento de doenças no ambiente assistencial pode estar relacionado rotineiramente ao uso de técnicas incorretas de limpeza e desinfecção das superfícies, ao manejo inadequado dos resíduos, à exposição ao risco ocupacional, pois, mesmo na presença do uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPI), se houver inconformidades, aquelas medidas de prevenção que serviriam como controladores de infecção, podem passar a funcionar como disseminadores de patógenos (CHAVEZ et al., 2015). Superfícies inanimadas representam um importante reservatório de micro-organismos e requerem métodos eficientes de limpeza e desinfecção.

Segundo a Portaria nº 2.616 de 1998, do Ministério da Saúde, as infecções hospitalares constituem risco significativo à saúde dos usuários dos hospitais, e sua prevenção e controle envolvem medidas de qualificação de assistência hospitalar, da vigilância sanitária e outras, tomadas no âmbito do Estado, do Município e de cada

hospital, pertinentes ao seu funcionamento (BRASIL, 1998). A mesma portaria manteve a obrigatoriedade da existência de um PCIH em todos os hospitais do país, onde se trata da organização e competências da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar - CCIH e do Programa de Controle de Infecção Hospitalar - PCIH, além de estabelecer os conceitos e critérios de diagnósticos das Infecções Hospitalares, dá orientações sobre a vigilância epidemiológica destas infecções e seus indicadores, faz recomendações sobre a higiene das mãos e enfatiza a observância de publicações anteriores do Ministério da Saúde quanto ao uso de germicidas, microbiologia, lavanderia e farmácia (OLIVEIRA; MARUYAMA, 2008). Algumas das medidas de controle e prevenção de IRAS podem ser observadas na Figura 2.

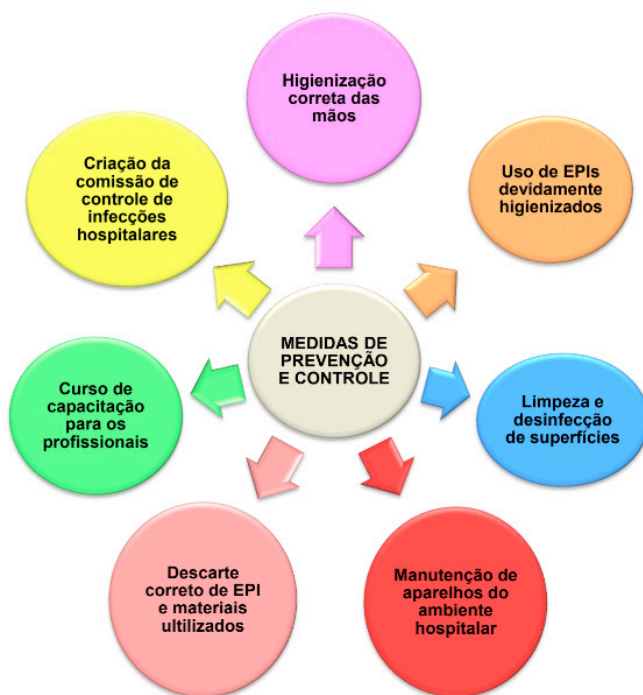


Figura 2. Medidas de prevenção e controle de infecções nos ambientes hospitalares.

Fonte: Os Autores.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As maiores taxas de infecções se encontram nas UTIs, com as pessoas imunocomprometidas sendo as mais suscetíveis, no qual a bactérias mais encontradas são a *Escherichia coli*, *Proteus sp.*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter sp.* *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas sp.*, *Stenotrophomonas sp.*, *Burkholderia sp.*, *Acinetobacter*

sp., *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) e *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE). Já referente aos locais de identificação, estão às grades de camas, torneiras, teclados, monitores e maçanetas.

Dessa forma, mesmo com a criação de programas visando a prevenção e o controle de IRAS, o conhecimento acerca do tema ainda é pouco discutido e implementado como forma de diminuir e até erradicar as infecções hospitalares, tanto por parte dos profissionais atuantes ou não, como dos gestores e administradores hospitalares. Existe um elo crítico entre a ocorrência de IRAS, a segurança do paciente e a qualidade dos serviços de saúde. A prevenção e controle das IRAS é possível, e esforços devem ocorrer para o desenvolvimento de novas estratégias e iniciativas, na busca contínua de melhoria da qualidade assistencial e segurança dos pacientes.

## REFERÊNCIAS

AYCAN, I. O. et al. Colonização bacteriana por causa do aumento da carga de trabalho da equipe de enfermagem em unidade de terapia intensiva. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 65, n. 1, p. 180-185, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 2616, de 12 de maio de 1998**. Disponível em: <[https://bvsmis.saude.gov.br/bvsmis/saudelegis/gm/1998/prt2616\\_12\\_05\\_1998.html](https://bvsmis.saude.gov.br/bvsmis/saudelegis/gm/1998/prt2616_12_05_1998.html)>. Acesso em: 23 de julho de 2020.

CARAÇA, B. A. A.; SISTI, E. A relevância do *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) nas infecções hospitalares. **Revista Interdisciplinar de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 4, n. 1, 2016.

CHAVES, L. D. P. et al. Governança, higiene e limpeza hospitalar: Espaço de gestão do enfermeiro. **Texto Contexto Enfermagem**, v. 24, n. 4, p. 1166-74, 2015

COELHO NETO, G.T. et al. Detecção de enterobactérias em superfícies de uma unidade mista de saúde no município de São Luís, Maranhão, Brasil. **Revista de Investigação Biomedica Uniceuma**, v. 1, n. 2, p. 77-84, 2010.

CORREAL, J. C. D. et al. Infecções por *Staphylococcus aureus*: mudança do perfil epidemiológico no Hospital Universitário Pedro Ernesto. **Revista HUPE**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 3, jun/set, 2013.

COSTA, A. L. P.; SILVA JUNIOR A. C. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e saúde pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica**, Macapá, v. 7, n. 2, p. 45-57, 2017.

DAMASCENO, Q. **Características epidemiológicas dos microrganismos resistentes presentes em reservatórios de uma Unidade de Terapia Intensiva** (dissertação de mestrado). Belo Horizonte: Escola de Enfermagem/UFGM; p.104, 2010.

DELLALIBERA-JOVILIANO, R.; DE MELO, S. A.; CENI, H. M R. Therapeutic alternatives and application of bacteriophages as a strategy in the use of bacterial diseases. **Revista De Medicina**, v. 99, n. 1, p. 88-95, 2020.

DRESCH, F. et al. Contaminação de superfícies localizadas em unidades de terapia intensiva e salas de cirurgia: uma revisão sistemática da literatura. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, Santa Cruz do Sul, v. 8, n. 1, jan, 2018.

DYAR, O. J.; PAGANI, L.; PULCINI, C. Strategies and challenges of antimicrobial stewardship in long-term care facilities. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 1, p. 10-19, 2015.

FARIÑA, N. Resistencia bacteriana: un problema de salud pública mundial de difícil solución. **Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud**, Asunción, v. 14, n. 1, abril, 2016.

FELIX, C. C. P.; MIYADAHIRA, A. M. K. Avaliação da técnica de lavagem das mãos executada por alunos do curso de Graduação em Enfermagem. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 43, n. 1, p. 139-145, 2009.

FERNANDES, A. T. **Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde**. São Paulo: Atheneu, 2000.

FERREIRA, A. M. et al. Colchões do tipo caixa de ovo: um reservatório de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina?. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 45 n. 1, p. 161-166, 2011a.

FERREIRA, A. M. et al. Condition of cleanliness of surfaces close to patients in an intensive care unit. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 19, n. 3, p. 557-64. Ribeirão Preto, Maio/jun, 2011b.

FRANCISCO, M. R. C. M. **Caracterização de isolados de *Aspergillus* provenientes de ambiente hospitalar – identificação molecular e determinação dos padrões de susceptibilidade aos antifúngicos** (Dissertação de Mestrado). Universidade de Lisboa, 2017.

GARCIA, P. G. et al. Contaminação Microbiana de Estetoscópios em Duas Unidades Hospitalares do Estado de Minas Gerais. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 29:e-2008, 2019.

GARCIA, P. G. et al. Avaliação da contaminação microbiana em computadores utilizados em um hospital público da cidade de Juiz de Fora. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 28: e-1957, 2018.

HESELTINE, P. Why don't doctors and nurses wash their hands?. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, Cambridge, v. 22, n. 4, p. 199-200, jan, 2001.

HUANG, S. S.; DATTA, R.; PLAT, R. Risk of acquiring antibiotic-resistant bacteria from prior room occupants. **Archives of internal medicine**, v. 166, n. 16, p. 1945-1951, 2006.

KALIL, A. C. et al. Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. **Clinical Infectious Disease**, v. 63, n. 5 p. e61-e111, 2016.

KADOSAKI, L. L.; SOUSA, S. F.; BORGES, J. C. M.. Análise do uso e da resistência bacteriana aos antimicrobianos em nível hospitalar. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 93, n. 2, p. 128-135, 2012.

KLINGSPOR, L. et al. Epidemiology and outcomes of patients with invasive mould infections: a retrospective observational study from a single centre (2005-2009). **Mycoses**, v. 58, n. 8, p. 470-77, 2015.

MACEDO JÚNIOR, A. M. Multirresistência bacteriana e a consequência do uso irracional dos antibióticos. **Scire Salutis**, v. 9, n. 2, Fev/Mai, 2019.

MAGALHÃES, A. M. A. T. **AVALIAÇÃO DO CONTRIBUTO NA QUALIDADE DO AR INTERIOR HOSPITALAR DA HUMIDADE E DOS FUNGOS** (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 2009.

MARCHAIM, D.; KAYE, K. Infections and antimicrobial resistance in the intensive care unit: Epidemiology and prevention. **UpToDate**, 2017.

MIRANDA, A. R. A. **ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS INFECÇÕES DE SÍTIO CIRÚRGICO EM CIRURGIAS ORTOPÉDICAS COM IMPLANTE EM UM HOSPITAL DE REABILITAÇÃO** (Dissertação de Mestrado). Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.

MIRZAI, M. et al. Distribution of bacterial contamination in a teaching hospital in Tehran - a special focus on *Staphylococcus aureus*. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 59, n. 1, p. 1-11, 2012.

MOURA, A. dos S. et al. Resistência bacteriana associada aos casos de infecção hospitalar na Santa Casa de Misericórdia de Passos (MG): estudo de caso. **Ciência et Praxis**, v. 11, n. 2, 2018.

MORAES, C. L. et al. Contaminação de equipamentos e superfícies de unidades de terapia intensiva de uma maternidade pública por *Staphylococcus coagulase negativa*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 42, n. 4, p. 387-394, 2013.

OLIVEIRA, A. C.; SILVA, M. das D. M.; GARBACCIO, J. L.. Vestuário de profissionais de saúde como potenciais reservatórios de micro-organismos: uma revisão integrativa. **Texto e Contexto Enfermagem**, Florianópolis, vol. 21, n. 3, p. 684-691, 2012.

OLIVEIRA, R.; MARUYAMA, S. A. T. Controle de infecção hospitalar: histórico e papel do estado. **Revista Eletronica de Enfermagem**, v. 10, n. 3, p. 775-783, 2008.

QUEENAN, A. N.; BUSH, K. Carbapenamases: the versatile beta-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 440-58, Jul, 2007.

RODRIGUES, A. G. et al. Contaminação bacteriana em teclados de computadores utilizados em hospital universitário do nordeste do Brasil. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 45, n. 1, p. 39-48, 2012.

ROSA, J. E. C. **Multirresistência bacteriana – uma “nova” terapêutica: bacteriófagos** (Dissertação de mestrado). Covilhã: Universidade Beira Interior, Ciências da Saúde, 2015.

ZANOL, F. M.; CANTARELLI, V. V. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC): um mecanismo de resistência emergente. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 48, n. 3 supl. 1, p. 4-9, 2016.

## BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS VISANDO ESTUDOS DE AMILASES E PECTINASES COM APLICAÇÃO EM PROCESSOS INDUSTRIAIS

Data de aceite: 01/10/2020

Data de submissão: 07/09/2020

### Daniel Borba Zanelatto

Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Departamento de Biologia  
Ribeirão Preto – SP  
CV: <http://lattes.cnpq.br/4448650794698569>

### Mariana Cereia

Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Departamento de Biologia  
Ribeirão Preto – SP  
CV: <http://lattes.cnpq.br/8768554144450014>

### Tássio Brito de Oliveira

Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Departamento de Biologia  
Ribeirão Preto – SP  
CV: <http://lattes.cnpq.br/9280078075342223>

### Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli

Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Departamento de Biologia  
Ribeirão Preto – SP  
CV: <http://lattes.cnpq.br/0162059400153020>

**RESUMO:** A bioprospecção é a forma ou método de localizar, avaliar e explorar de maneira organizada e legal a biodiversidade de um determinado local visando a busca de recursos genéticos e bioquímicos para fins

econômicos. Com a crescente consciência da importância e do valor da biodiversidade usada como matéria-prima, o objetivo desse trabalho foi realizar, inicialmente, a coleta de fungos filamentosos no Bosque do Jardim Botânico, no município de Araraquara-SP. Foram coletadas 11 amostras, sendo estas de solo, tronco e formigueiro. Este material foi inoculado em placas de Petri contendo meio sólido de aveia, para o isolamento dos fungos filamentosos. Parte dos fungos (14 isolados escolhidos das 11 amostras) foi identificada até gênero através de técnicas de microcultivo, mediante a observação microscópica de estruturas morfológicas. Em seguida, foram identificados na Micoteca URM, Universidade Federal de Pernambuco. Os resultados foram comparados usando novamente a técnica de microcultivo no Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular do Departamento de Biologia da FFCLRP-USP. Os gêneros identificados foram *Trichoderma*, *Acremonium*, *Absidia*, *Rhizopus* e *Mucor*. A seguir, foram verificadas as produções de amilase e pectinase por meio de experimentos de cultivo dos fungos em meios sólidos. Após o crescimento dos fungos por 2 dias, os meios foram corados com solução de lugol e vermelho de rutênio para amilase e pectinase, respectivamente. Foram identificados poucos fungos bons produtores. Desta forma, foi realizado um *screening* em cultivos submersos para a produção das enzimas supracitadas. Nessas condições observou-se que, comparado à literatura, não havia fungos bons produtores de amilases, mas o contrário foi verificado para pectinases, onde pelo menos, dois fungos do gênero *Trichoderma* produziram altos níveis



enzimáticos. Desta forma conclui-se que o estudo de prospecção foi bastante satisfatório para fins de degradação de biomassa e possibilidade de produção de biocombustíveis e outras aplicações biotecnológicas na indústria.

**PALAVRAS - CHAVE:** fungos; amilase; pectinase; aplicação industrial; bioprospecção.

## FILAMENTOUS FUNGI BIOPROSPECTION AIMING STUDIES ON AMYLASES AND PECTINASES SUITABLE FOR INDUSTRIAL PROCESSES

**ABSTRACT:** Bioprospecting is the method of locating, assessing, and exploring the biodiversity of a given location in an organized and legal manner, with the aim of seeking genetic and biochemical resources for economic purposes. With the growing awareness of the importance and value of the biodiversity used as raw material, the objective of this work was to collect filamentous fungi at Bosque do Jardim Botânico, in the municipality of Araraquara-SP. Eleven samples of soil, trunk, and anthill were collected. This material was inoculated in Petri dishes containing solid oat medium and then the isolation of the filamentous fungi was carried out. Part of the fungi (14 isolates chosen from 11 samples) was identified up to the genus employing microculture techniques, through microscopic observation of morphological structures. Then, they were identified by the URM Culture collection, from the Federal University of Pernambuco. The results were compared again by the microculture technique at the Laboratory of Microbiology and Cell Biology of the Department of Biology at FFCLRP-USP. The identified genera were *Trichoderma*, *Acremonium*, *Absidia*, *Rhizopus*, and *Mucor*. The amylase and pectinase production were verified using fungi cultivation experiments in solid medium. After the growth of the fungi for 2 days, the media were stained with lugol solution for amylase, and ruthenium red for pectinase. Few good producing fungi have been identified. Therefore, a screening was carried out on submerged cultures for the production of the mentioned enzymes. In these conditions, it was observed that, compared to the literature, there were no good amylase-producing fungi, but the opposite was verified for pectinases, where at least two *Trichoderma* produced high enzymatic levels. Thus, it is concluded that the prospection study was quite satisfactory for the purpose of biomass degradation, biofuel production, and other biotechnological applications in the industry.

**KEYWORDS:** fungi; amylase; pectinase; industrial applications; bioprospecting.

## 1 | INTRODUÇÃO

### 1.1 Bioprospecção e Os Fungos Filamentosos

A bioprospecção pode ser definida como a busca por materiais biológicos, sejam eles os próprios seres vivos ou partes desses, tais como enzimas, material genético e outros compostos que possam ser úteis para a humanidade. Uma das áreas que mais usufrui da bioprospecção é a biotecnologia com a ação direta ou indireta na produção farmacêutica, fitoterápica, alimentícia, têxtil, agrícola, entre tantos outros setores (Meteo *et al.*, 2014; de Almeida *et al.*, 2015).

Fungos podem ser prospectados e possuem uma enorme gama de atividades – como patógenos de plantas de lavoura ou humanos, como organismos decompositores, como

modelos em experimentos de investigação genética e biologia celular, e como produtores de vários metabólitos importantes, entre eles, as enzimas. Em termos de biodiversidade, existem cerca de 140.000 espécies descritas, no entanto, estimativas apontam que essa riqueza possa chegar de 2,2 a 3,8 milhões de espécies (Hawksworth e Lücking, 2017; Lücking *et al.*, 2020).

Quanto ao habitat, podem ser aquáticos de água doce ou marinhos, mas a maioria é terrestre. Habitam o solo e a matéria vegetal morta e desempenham papéis cruciais na mineralização do carbono orgânico. Podem crescer em ambientes extremos de baixo pH ou temperaturas elevadas e esse fato, associado à facilidade de dispersão dos esporos, torna esses organismos contaminantes comuns de produtos alimentícios, meios de cultura microbianos e superfícies de todos os tipos. Em geral são quimiorganotróficos, apresentando exigências nutricionais simples, sendo a maioria aeróbia. Alimentam-se por meio da secreção de enzimas que digerem polissacarídeos e proteínas em seus constituintes monoméricos (Madigan *et al.*, 2016).

## 1.2 Principais Fungos com Aplicação na Indústria

Um gênero conhecido de fungos é o *Aspergillus*, que foi descrito pela primeira vez em 1729 pelo padre e cientista italiano Pier Antonio Micheli, que o nomeou assim pela semelhança do formato típico dos seus conídios com um aspersório (*aspergillum*, em latim). A morfologia do conidióforo, correspondente à estrutura de esporos assexuados, é a mais importante utilizada na taxonomia de *Aspergillus* (Bennett, 2010). As espécies de *Aspergillus* estão entre os grupos de maior sucesso, com papéis importantes nos ecossistemas naturais e na economia humana. A maioria das espécies é adaptada para a degradação de polímeros vegetais complexos, mas podem também forragear substratos tão diversos quanto esterco, tecidos e pergaminho (Cerqueira *et al.*, 2013). Além disso, estão envolvidos em muitos processos industriais, incluindo a produção de enzimas nas indústrias farmacêuticas e de bebidas alcoólicas, produtos químicos de base (por exemplo, ácido cítrico) e alimentos (por exemplo, molho de soja) (Polizeli *et al.*, 2005).

Outro exemplo de gênero é o *Trichoderma*, cosmopolitas nos solos e na decomposição de madeira e matérias vegetais. As espécies de *Trichoderma* são frequentemente componentes dominantes da Funga do solo em habitats muito variados. Isso pode ser atribuído às diversas capacidades metabólicas desse gênero e sua natureza agressivamente competitiva. Substâncias produzidas por esses fungos são utilizadas, por exemplo, como fármacos pós-transplantes para evitar rejeição (Chong *et al.*, 2009), além de serem usados em diversas outras atividades humanas, incluindo aplicações comerciais na produção de enzimas e controle biológico de doenças de plantas, pois algumas espécies são micoparasitas (Polizeli *et al.*, 2005).

Os fungos do gênero *Acremonium* contém cerca de 150 espécies. A maioria das espécies são sapróbios, sendo isolada de material vegetal em decomposição e do solo,

desempenhando um papel vital na ciclagem de nutrientes. Outros são patógenos de plantas, insetos e outros fungos (Perdomo *et al.*, 2011). O antibiótico cefalosporina foi derivado do *Acremonium*, que era chamado de *Cephalosporium* (Dorland, 2010).

Alguns fungos do filo Mucoromycota são bem conhecidos em aplicações industriais, tais como *Rhizopus*, *Mucor* e *Absidia*. *Rhizopus* é um gênero saprofítico comum em plantas e que age como parasita em animais. Pode ser encontrado em uma grande variedade de substratos orgânicos, incluindo frutas, legumes, pães, couro e tabaco (Damasio *et al.*, 2011; Peixoto *et al.*, 2003, Peixoto-Nogueira *et al.*, 2008). Dentro desse gênero, destaca-se a espécie *Rhizopus stolonifer*, que tem considerável importância industrial, e outras espécies são responsáveis por doenças em plantas e animais.

*Mucor* é um gênero bastante comum e difundido na natureza, aparecendo no solo, vegetação em processo de decomposição, esterco e vários outros habitats com considerável umidade onde fungos com crescimento rápido possuem vantagens. Morfologicamente esse gênero distingue-se de *Rhizopus* pela ausência de rizóides. Representantes do gênero destacam-se pela capacidade de produção de amilase, lipase, poligalacturonase e protease (Alves *et al.*, 2002).

O gênero *Absidia* é cosmopolita, habitando o solo da maior parte do planeta. As principais características são os esporângios piriformes, presença de uma apófise abaixo dos esporângios e os estolões de onde surgem os esporangióforos (van Tieghem, 1876). O gênero comporta espécies mesofílicas com ampla importância biotecnológica, vista na biotransformação de esteroides e síntese de compostos semelhantes à renina (Hoffmann *et al.*, 2007).

### 1.3 Enzimas: aspectos gerais

As enzimas são há muito tempo utilizadas pelo ser humano, como na fabricação de cerveja e outras bebidas, queijos e laticínios, pães, fármacos, dentre outros (Pinho *et al.*, 2020). Pode-se encontrar no mercado enzimas de proveniência animal, vegetal e microbiana. Nos dois primeiros casos, a produção é dificultada devido as variações climáticas que devem ser controladas, pelo tempo de crescimento e desenvolvimento do produtor, a área de cultivo, maior facilidade de contaminação e por maior complexidade de extração. Por isso, as mais utilizadas são as enzimas microbianas, que podem ser manipuladas geneticamente mais facilmente e possuem menor custo de produção (Polizeli *et al.*, 2005, Pinho *et al.*, 2020).

Em 2017, o mercado global de enzimas foi avaliado em \$7,082 bilhões. Já em 2018, esse setor foi estimado para alcançar \$10,519 bilhões em 2024; tendo esse mercado uma taxa de crescimento anual composta de 5,7%, o que demonstra que as enzimas constituem um grande trunfo da indústria e do mercado, no futuro. O segmento que vem se destacando é o das carboidrases, que englobam as amilases e pectinases (Allied Market Research, 2018), enzimas abordadas neste trabalho.

As pectinases usam como substrato o polissacarídeo pectina, que está presente nas paredes celulares dos vegetais juntamente com celulose e hemicelulose. Quimicamente, as substâncias pécnicas são coloidais complexas, constituídas por polissacarídeos ácidos, com um esqueleto de resíduos de ácidos monogalacturônicos unidos por ligações  $\alpha$ -1,4. As ramificações da molécula de pectina consistem em L-ramnose, arabinose, galactose e xilose.

Com base no tipo de modificações da cadeia principal, as substâncias pécnicas são classificadas em protopectina, ácido pécnico, ácido pectínico e pectina. A protopectina após hidrólise produz pectina ou ácido pectínico; os ácidos pécnicos são os galacturonanos que contêm quantidades insignificantes de grupos metoxílicos; os ácidos pectínicos são galacturonanos com várias quantidades de grupos metoxílicos. Quatro diferentes tipos de polissacarídeos pécnicos podem ser encontrados: ramnogalacturonano I, ramnogalacturonano II, homogalacturonano e xilogalacturonano (**Figura 1**) (Polizeli *et al.*, 2013).

As substâncias pécnicas são hidrolisadas pelas pectinases, que incluem: polimetilgalacturonases (PMG) que catalisam a clivagem hidrolítica de ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas. Endo-PMG realiza a clivagem aleatória das ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas da pectina, preferencialmente pectina altamente esterificada; Exo-PMG que provocam clivagem sequencial da ligação  $\alpha$ -1,4-glicosídica da pectina a partir da extremidade não redutora da cadeia da mesma. Poligalacturonases (PG) catalisam a hidrólise de ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas do ácido pécnico (ácido poligalacturônico), sendo de dois tipos: Endo-PG, também são conhecidas como poli (1,4- $\alpha$ -D-galacturonideo) glicanohidrolase, que catalisa a hidrólise aleatória de ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas em ácido pécnico; Exo-PG, também conhecida como poli (1,4- $\alpha$ -D-galacturonideo) galacturonohidrolase, que catalisa a hidrólise de forma sequencial de ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas.

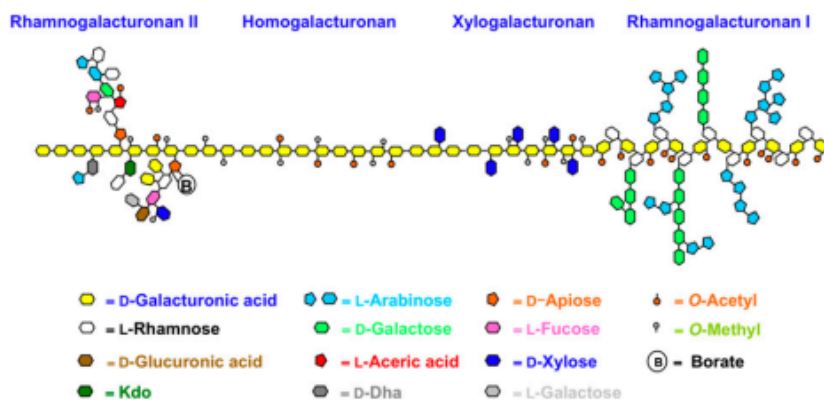


Figura 1: Estrutura esquemática da pectina com seus quatro polissacarídeos componentes (Harholt *et al.*, 2010).

As pectinases possuem diversas aplicações biotecnológicas, tais como nas indústrias de produção de sucos, têxtil, chás e algodão. Os organismos mais usados como produtores dessas enzimas são os fungos filamentosos. A ação das pectinases resulta no afrouxamento/solubilização da pectina junto às paredes celulares da planta. Quando o tecido é moído, a pectina é encontrada na fase líquida (pectina solúvel) causando um aumento na viscosidade, que acontece, por exemplo quando as frutas são espremidas para a fabricação de sucos. Com a adição de pectinases a viscosidade do suco diminui e aumenta o rendimento do produto (Kashyap *et al.*, 2001, Damasio *et al.*, 2011).

As amilases agem em ligações glicosídicas, que utilizam como substrato o amido, o principal carboidrato de reserva energética das plantas. Amido é o segundo polímero mais abundante da natureza, atrás apenas da celulose, e tem função de reserva energética vegetal. É formado unicamente por D-glicose, e quando degradado pode gerar glicose, maltose e xarope de oligossacarídeos menores (Polizeli *et al.*, 2016). O amido está presente nos vegetais em forma de grânulos, que podem ser compostos a partir de dois polímeros: a amilose, que é formada por cadeias lineares helicoidais formadas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 e a amilopectina, que apresenta grande número de ramificações de ligações  $\alpha$ -1,6 partindo da cadeia principal de ligações  $\alpha$ -1,4. Um esquema desse polímero pode ser visualizado na **Figura 2**.

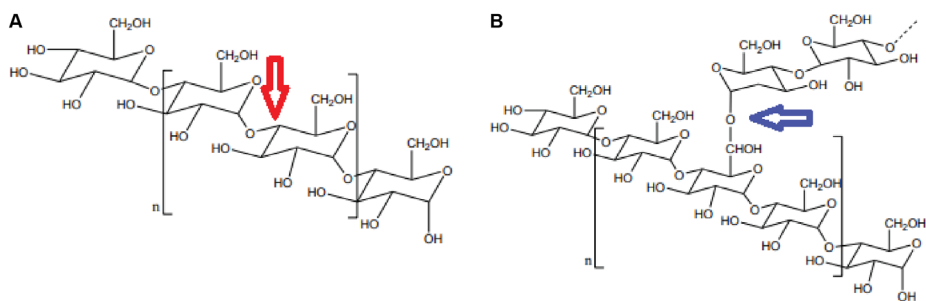


Figura 2. Estrutura do amido. a) Polímero linear de amilose. b) Polímero ramificado de amilopectina. A seta vermelha aponta uma ligação  $\alpha$ -1,4; enquanto a seta azul indica uma ligação  $\alpha$ -1,6 (adaptado de Mariano, 2013).

Diferentes tipos de amilase agem em distintas partes e ligações da cadeia de amido:  $\alpha$ -amilase hidrolisam ligações  $\alpha$ -1,4 liberando oligo e sacarídeos de variados tamanhos; a  $\beta$ -amilase hidrolisa ligações  $\alpha$ -1,4, porém especificamente a penúltima extremidade não-redutora, liberando  $\beta$ -maltose; a pululanase age no pululano; a isoamilase atua sobre glicogênio, amilopectina e oligossacarídeos; e a glucoamilase que atua em ambas as ligações citadas, podendo ocasionar a sacarificação, que é a hidrólise total do polímero.

Amilases são enzimas com grande potencial para aplicações industriais e

biotecnológicas, representando cerca de 25% do total daquelas comercializadas em todo o mundo. Possuem aplicação em áreas como indústria têxtil, papel, alimentícia, biocombustíveis, açúcar, xaropes, produtos de limpeza, além de reaproveitamento de resíduos e em técnicas biomoleculares (Polizeli *et al.*, 2016).

## 2 | OBJETIVOS E RESULTADOS OBTIDOS

O objetivo da presente pesquisa foi realizar a prospecção de fungos filamentosos coletados e isolados na região de Araraquara, SP, identificá-los, e apresentar um *screening* da produção de enzimas pectinolíticas e amilolíticas dos mesmos, a fim de obter fungos bons produtores das enzimas alvos.

As coletas foram realizadas no Bosque do Jardim Botânico do município de Araraquara (SP W 48° 10' 839" a 978" e longitude S 21° 45' 498" a 584", com elevação mínima de 593 e máxima de 674 metros). Foram coletadas amostras de tronco, coqueiro e folhas de bambu em decomposição, formigueiro, cogumelos orelha de pau, totalizando 11 amostras. Estes materiais foram inoculados em placas de Petri contendo meio sólido de aveia 4%, para o isolamento dos fungos filamentosos.

Catorze isolados foram identificados, no mínimo, até gênero, mediante a observação microscópica de estruturas morfológicas, através de técnicas de microcultivo. O resultado obtido mostrou a presença de: B1: *Trichoderma sp.*; B2: *Acremonium sp.*; B4: *Mucor luteus*; B7: *Trichoderma pseudokoningii*; B8: *Rhizopus sp.*; B10: *Trichoderma koningii* (**Figura 3A**), entre outros mais dez fungos identificados como D1a: *Rhizopus sp.*; D1b: *Trichoderma sp.*; D2: *Mucor sp.*; D3: *Absidia pseudocylindrospora*; D4: *Trichoderma pseudokoningii*; D5: *Mucor circinelloides*; D6: *Trichoderma pseudokoningii*; D7: *Trichoderma pseudokoningii* e D9: *Mucor luteus* (**Figura 3B**).

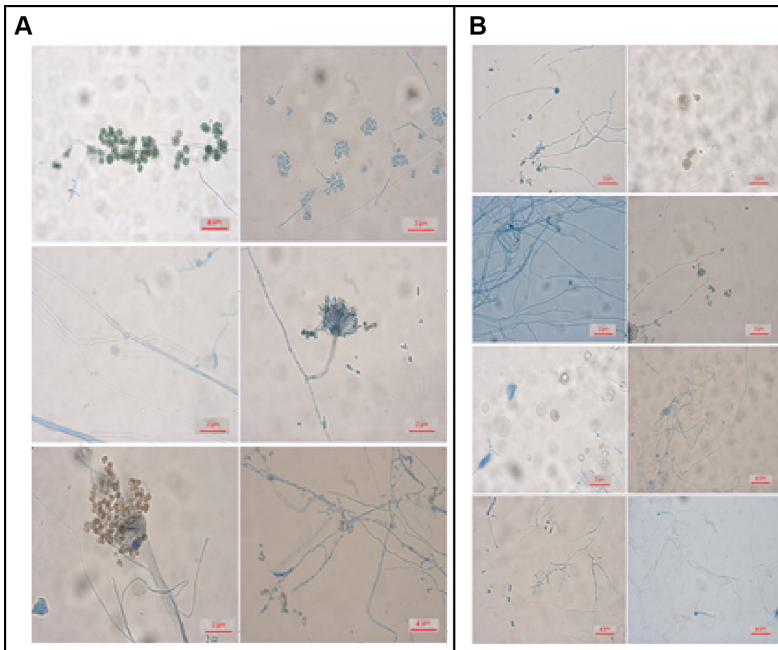


Figura 3. Micrografias dos fungos isolados a partir do material bruto coletado (A), da esquerda para a direita, de cima para baixo: B1, B2, B4, B7, B8 e B10, e do material coletado diluído (B), da esquerda para a direita, de cima para baixo: D1 (a+b), D2, D3, D4, D5, D6, D7 e D9.

Seguidamente à identificação, empregaram-se técnicas com corantes para detecção de atividade pectinolítica (**Figura 4**). Os fungos não apresentaram atividade amilolítica representativa em placas.

A produção de amilase e pectinase também foi estudada em fermentação submersa, por meio da determinação dos açúcares redutores pelo método de Miller (Miller, 1959), usando como substrato amido reagen 1% e ácido poligalacturônico sal sódico, respectivamente. Uma unidade de atividade enzimática (U/mL) correspondeu a hidrólise de 1  $\mu\text{mol}$  de açúcares redutores formados em 1 minuto, nas condições de ensaio, a 50°C. Dosou-se também as proteínas pelo método de Bradford (1976), para que fosse possível o cálculo da atividade específica em U/mg prot.

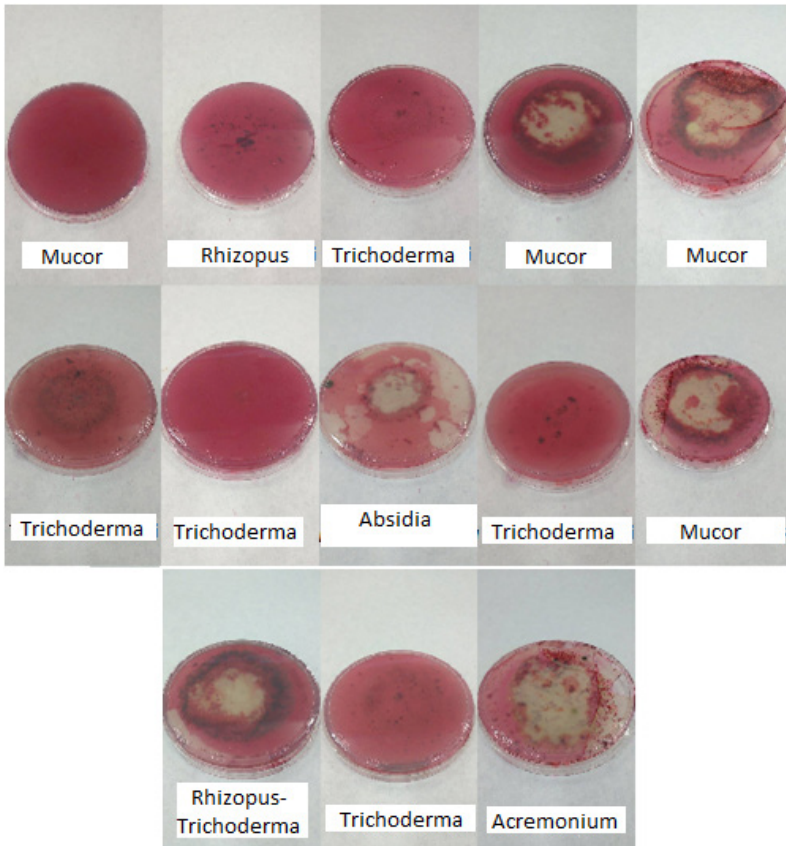


Figura 4. Fotografias do reverso das placas de Petri após banho com Vermelho de Rutênio para atividade pectinolítica, da esquerda para a direita: D2, B8, D7, D9, B4, D4, B10, D3, D6, D5, D1(a+b), B7 e B2.

Com relação à produtividade de amilase com os respectivos níveis proteicos (**Figura 5**) destacaram-se dois isolados de *Trichoderma*: B10 e D7, com cerca de 30 U/mg de proteína secretada.



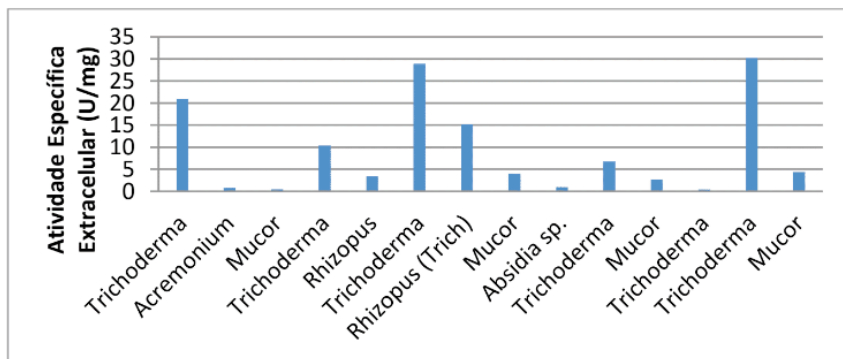


Figura 5. Atividade amilolítica específica extracelular (A). Os fungos correspondem a B1, B2, B4, B7, B8, B10, D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7 e D9.

Com relação às pectinases secretadas (**Figura 6**), referenciadas em atividades específicas, o *Trichoderma* B10 superou largamente os demais alcançando os níveis de 5554 U/mg. Esse isolado foi o resultado mais destacado da pesquisa.

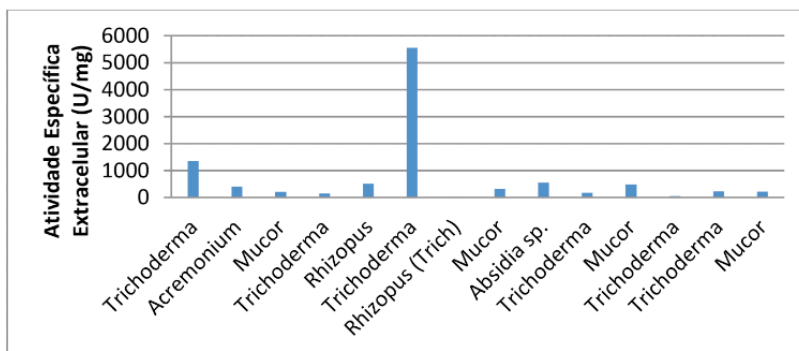


Figura 6. Atividade pectinolítica específica extracelular. Os fungos identificados pelo gênero correspondem respectivamente às amostras B1, B2, B4, B7, B8, B10, D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7 e D9.

Do ponto de vista filogenético, membros de dois grandes grupos de fungos foram isolados e tiveram a atividade analisada, sendo dos filos Ascomycota e Mucoromycota. Assim, os gêneros *Absidia*, *Mucor* e *Rhizopus* são representantes do filo Mucoromycota, enquanto *Acremonium* e *Trichoderma* fazem parte do filo Ascomycota. Tem-se então que os melhores produtores de pectinases dentre os isolados analisados são do filo Ascomycota. Dentre as classes componentes deste, *Acremonium* e *Trichoderma* fazem parte do mesmo grupo (Sordariomycetes) e também da mesma família (Hypocreaceae), próximos filogeneticamente e distantes dos demais isolados, representantes do filo Mucoromycota.

Pela dosagem proteica, amilolítica e pectinolítica extracelulares conclui-se então que os fungos do gênero *Trichoderma* isolados foram os que apresentam alta atividade pectinolítica, o que é bastante satisfatório por poderem ser utilizados em processos bioquímicos importantes para as indústrias química, alimentícia, farmacêutica e biotecnológica. Quanto às enzimas amilolíticas, nenhum isolado apresentou atividade relevante quando comparadas ao que se tem na literatura.

Alguns *Trichoderma* apresentaram elevadíssimos valores em atividade pectinolítica, porém não todos, o que sugere uma diversidade coletada dentro desse gênero. Assim como ele, o representante do gênero *Acremonium*, que apresentou alguns bons valores, encontra-se também no filo Ascomycota, sendo próximos filogeneticamente além de serem os melhores produtores coletados. Mesmo os isolados que não apresentaram bons resultados podem ser bons produtores enzimáticos, entretanto uma caracterização mais aprofundada dos fungos e das enzimas para obter as condições ótimas de crescimento, produção e reação pode revelar melhores resultados no futuro.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, M. H. *et al.* **Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 33, n. 4, p. 325-330, 2002.
- BENNETT, J. W. **An overview of the genus *Aspergillus*.** Portland: Caister Academic Press, 2010. 238 p.
- BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Analytical Biochemistry, 72: 248-254. 1976.
- CERQUEIRA, G. C. *et al.* **The *Aspergillus* Genome Database: multispecies curation and incorporation of RNA-Seq data to improve structural gene annotations.** Nucleic Acids Research, v. 42 p. D705-D710, 2013.
- CHONG, F. W. *et al.* **Expression of transforming growth factor- $\alpha$  and determination of apoptotic index in histopathological sections for assessment of the effects of Apigenin (4', 5', 7'-Trihydroxyflavone) on Cyclosporine A induced renal damage.** Malaysian Journal of Pathology, v. 31, n. 1, p. 35-43, 2009.
- DAMASIO, A. R. L. *et al.* **Biotechnological potential of alternative carbon sources for production of pectinases by *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*.** Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 54, p. 141- 148, 2011.
- DE ALMEIDA, J. R. M.; COLLARES, D. G.; BARBOSA, P. F. D. **Bioprospecção microbiana.** Embrapa Agroenergia-Folder/Folheto/Cartilha (INFOTECA-E), 2015.
- DORLAND, N. W. **Dorlands medical dictionary: antibacterial.** Archived from the original on (2010 Nov 17), Retrieved (2010 Oct 29), 2010.

HARHOLT, J.; SUTTANGKAKUL, A.; SCHELLER, H. V. **Biosynthesis of pectin**. Plant physiology, v. 153, n. 2, p. 384-395, 2010.

HAWKSWORTH, D.; LÜCKING, R. **Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species**. Microbiology spectrum, v. 5, n 4, 2017.

HOFFMANN, K.; DISCHER, S.; VOIGT, K. **Revision of the genus *Absidia* (*Mucorales*, *Zygomycetes*) based on physiological, phylogenetic, and morphological characters; thermotolerant *Absidia* spp. form a coherent group, Mycocladiaceae fam. nov.** Mycological research, v. 111, n. 10, p. 1169-1183, 2007.

<https://www.alliedmarketresearch.com/enzymes-market> (acessado em 20/04/2019)

KASHYAP, D.R. *et al.* **Applications of pectinases in the commercial sector: A review**. Bioresources Technology, v. 77, p. 215-227, 2001.

LÜCKING, R. *et al.* **Unambiguous identification of fungi: where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding?** IMA Fungus v. 11, p. 14, 2020.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed, 2016. 1032 p.

MARIANO, M. **Obtenção, caracterização e aplicação de nanocristais de celulose obtidos a partir do sisal**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2013.

METEO, N.; NADER, W.; TAMAYO, G. **Bioprospecting**. INBio. P. 471-488, 2014.

MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar**. Analytical chemistry, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

PEIXOTO, S.C. *et al.* ***Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*: a thermophilic fungus with potential for production of thermostable amylases**. International Microbiology., 6(4): 269-273, 2003.

PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C. *et al.* **Evidence of thermostable amylolytic activity by *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* using wheat bran and corncob as alternative carbon source**. Bioprocess Biosystem Engineering 31: 329-334, 2008.

PERDOMO, H. *et al.* **Spectrum of clinically relevant *Acremonium* species in the United States**. Journal of Clinical Microbiology v. 49, n. 1, 243-56, 2011.

PINHO, I. M., SCARCELLA, A. S. A. & POLIZELI, M. L. T. M. **Produção de um consórcio enzimático visando obtenção de Etanol 2G a partir do bagaço de cana**. In: Tópicos Multidisciplinares em Ciências Biológicas 3 / Organizador Edson da Silva. – Ponta Grossa, PR: Atena, pp. 43-66. 2020.

POLIZELI, M.L.T.M. CARVALHO, C.C.; POLIZELI, A.M. **O Sistema Amilolítico**. In: Amilases Microbianas. São Paulo – Editora da Universidade de São Paulo – EDUSP. Editores: T. M. Silva & M. L. T. M. Polizeli, pp. 23-32, 2016.

POLIZELI, M. L. T. M. *et al.* **Pectinases Produced by Microorganisms.** *In:* Fungal Enzymes, M. L. T. M. Polizeli and M. Rai. (Org.). 1ed. Boca Raton USA: CRC Press, v. 1, p. 316-340, 2013.

POLIZELI, M.L.T.M. *et al.* **Xylanases from fungi: properties and industrial applications.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67: 577-591, 2005.

van TIEGHEM, P. **Troisième mémoire sur les Mucorinées.** *Annales des Sciences Naturelles, Botanique*, sér. v. VI, n. 4, p. 312–399, 1876.

## INDUSTRIAL YEAST STRAINS RESISTANCE TO NATURAL BIOACTIVE COMPOUNDS

Data de aceite: 01/10/2020

Data de submissão: 16/09/2020

### Patrícia Regina Kitaka

Universidade Estadual de Campinas -  
UNICAMP

Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas  
Biológicas e Agrícolas (CPQBA), Paulínia - SP,  
Brazil

<http://lattes.cnpq.br/8916720523524200>

### Marta Cristina Teixeira Duarte

Divisão de Microbiologia - Centro  
Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas  
Biológicas e Agrícolas (CPQBA), UNICAMP,  
Paulínia - SP, Brazil

<http://lattes.cnpq.br/6011782448349535>

### Valéria Maia de Oliveira

Divisão de Recursos Microbianos - Centro  
Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas  
Biológicas e Agrícolas (CPQBA), UNICAMP

<http://lattes.cnpq.br/3886687872358496>

### Maria da Graça S. Andrietta

Divisão de Bioprocessos - Centro  
Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas  
Biológicas e Agrícolas (CPQBA), UNICAMP

<http://lattes.cnpq.br/3835309163911239>

**ABSTRACT:** This chapter briefly provides an overview about industrial yeast strains, more specifically about yeast strains applied in the fermentation processes in Brazilian fuel-ethanol production industry. In the first section, historical aspects of fermentation and the use of yeast

strains in Brazil are discussed and the concepts about selected yeast and native autochthonous, yeast strains are lightly addressed. Subsequent sections present the molecular differentiation among yeast strains and a brief explanation about the industrial application of natural bioactives, especially essential oils. Finally, the resistance profile of 20 industrial yeast strains is reported for 40 plant-derived essential oils, extracted from Brazilian and exotic medicinal and aromatic plants.

**KEYWORDS:** *Saccharomyces sensu stricto* group; yeast strains; Essential Oils; Industrial applications

### RESISTÊNCIA DE LINHAGENS DE LEVEDURAS INDUSTRIAIS A COMPOSTOS BIOATIVOS NATURAIS

**RESUMO:** Este capítulo fornece resumidamente uma visão geral sobre cepas de leveduras industriais, mais especificamente sobre cepas de leveduras aplicadas nos processos de fermentação na indústria brasileira de produção de etanol-combustível. Na primeira seção, aspectos históricos da fermentação e do uso de cepas de levedura no Brasil são discutidos e os conceitos sobre leveduras selecionadas e cepas de leveduras autóctones nativas são levemente abordadas. As seções subsequentes apresentam a diferenciação molecular entre cepas de leveduras e uma breve explicação sobre a aplicação industrial de bioativos naturais, especialmente óleos essenciais. Finalmente, é relatado o perfil de resistência de 20 cepas de leveduras industriais para 40 óleos essenciais de origem vegetal, extraídos de plantas medicinais e

aromáticas brasileiras e exóticas.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Saccharomyces sensu stricto*; linhagens de levedura; Óleos essenciais; Aplicações industriais.

## 1 | FERMENTATION AND YEASTS – HISTORY AND BRIEF OVERVIEW

Humans have adopted fermentation practices to produce fermented foods and alcoholic beverages since ancient times, although the protagonist of this process stayed “invisible” for centuries, being used through empirical observations without knowing their chemical and microbiological bases (AMORIM et al., 2005).

Inventions and innovations using fermentation and yeasts were done along the history based on observations and almost no knowledge about microorganisms, including the presence of yeasts as the main element in the fermentation processes. As a matter of fact, it would be several centuries of years before it was even known that microscopic organisms existed.

Antonie van Leeuwenhoek was the first to observe cells using a primitive microscope in 1680, when the seeds of Microbiology were sown.

Since then, scientific information has grown at an exponential rate. In some fields such as Chemistry and Biology, especially in Microbiology and Biotechnology this explosion of knowledge is more evident. This progress has been impacted by some of the most significant names in the history of sciences, including van Leeuwenhoek, Lavoisier, Gay-Lussac, Pasteur, Buchner and Koch.

More recently, important names in modern science argued that “*the most important test tube in the birth and growth of the modern life sciences is the fermenter*”, and “*the most important model organism has been the yeast *Saccharomyces cerevisiae**”, commonly known as baking yeast, brewing or wine yeast (CHAMBERS; PRETORIUS 2010).

## 2 | YEASTS

Yeasts have been widely studied and used to produce value-added products by different industrial segments. One clear example is the origin of the word enzyme - ‘en’ meaning within and ‘zyme’ meaning leaven. Yeasts have been an important part of pioneer works in several fields, particularly in life sciences as Microbiology and Enzymology (BARNETT, 1998, 2000; BARNET & LICHTENTHALER, 2001).

Among the yeasts, *Saccharomyces* genus should be highlighted because microorganisms inside this group were the first domesticated microorganisms. Besides that, they usually are related to several fermentation processes for industrial purposes.

In Brazil, as much as all over the world, the relevance of *Saccharomyces* genus covers most important biological systems, since it is highly employed as an eukaryotic organism model as well as widely used in industrial processes like bakery, wine industry

and brewery due to its key role in fermentative process.

However, in Brazil these yeasts go beyond the application in conventional industrial segments and have a very important role in the biofuels industry. That is the reason why it is so necessary to know the characteristics of these microorganisms and their behavior in different situations.

### **31 YEASTS AND FERMENTATION PROCESSES IN BRAZILIAN FUEL-ETHANOL PRODUCTION INDUSTRY**

Brazil has taken a notorious place in the biofuels worldwide scenario.

Nowadays, Brazil is the largest sugarcane's bioethanol producer in the world, producing over 30 billion liters in 2019 (UNICA, 2019; UDOP, 2020).

Although this country has been producing ethanol since the 1930s through fermentation processes, at that time serendipity presumably played an important role in the process since fermentations resulted from empirical observations of natural events. Indeed, the experience with the processes were generated in harnessing repeat 'experiments' in which the improvements were made by trialling modifications to practices and were communicated down through the generations, retaining the results that were beneficial and discarding those that failed (ALBA-LOIS; SEGAL-KISCHINEVZKY, 2010).

It was just in the 1990s that Brazilian distilleries started to use yeasts referred to as pure, purchased by manufacturers with required characteristics for the fermentation processes to industrial production of fuel-ethanol (AMORIM et al., 2011).

One might argue that the early use of yeasts in bioethanol production was based on little or no knowledge of microbiology that drives fermentation. In fact, it would be several decades before it was even known population dynamics of microorganisms in the fermentative processes.

Since then, several scientific groups have dedicated efforts to unravel the fermentation process in order to understand the major actor in this process - the yeasts.

The power of change which the understanding about these simple, unicellular microorganisms have caused in life science related to the fuel-ethanol industry could be described as a revolution.

This scientific revolution in bioethanol industry, range from prospection and identification methods, as done by Basso et al. (2008) until the potential modification for different applications described by Argueso et al. (2009) and Gu and Oliver (2009), passing through the characterization of the biodiversity of strains, as studied by Steckelberg (2001), Basso et al. (2004) and Tosetto (2008).

Nevertheless, until nowadays it is a challenge to understand completely the fermentation processes and all the dynamics related to this useful microorganism which has played a pivotal role in this process - *Saccharomyces cerevisiae*.

One of the reasons why it is difficult to reveal all the answers regarding the difficulties to be overcome in Brazilian fermentation processes could be explained by the operational conditions.

Most industrial processes installed for biofuel production in that country, use yeast cell recycling. However, this strategy promotes operations with high cell concentration, and dynamizes the fermentation, making it faster. On the other hand, these choices allow conditions favorable to grow contaminating bacteria and yeasts.

Besides that, fuel-ethanol industrial fermentations processes are subject to huge selective pressure considering oscillation in several attributes as temperature, pH, ethanol and sugar concentrations along all the process and also during the harvest season period, resulting in the growth and persistence of yeasts adapted to stress conditions.

For this reason, the fuel-ethanol industry has been incessantly trying to overcome the problems with the main bottleneck in the process – fermentation and, consequently, yeasts.

*Saccharomyces cerevisiae* has shown remarkable attributes and plays an important role in fermentation processes due to its versatility and capacity to act in different kinds of substrates (STRATFORD, 2006).

However, there are many differences inside the universe of *Saccharomyces* sp. This understanding just surfaced because of the explosion of knowledge sparked by the advent of gene technology which drove a convergence of several fields of life sciences, under the banner of molecular biology (CHAMBERS; PRETORIUS 2010).

Molecular biology brought light to several parts of biology, clarifying several processes and explaining the development of some microorganisms, including the yeasts. This newest approach enabled us to understand them and explain why yeasts inside of the same species might present a completely different characteristics and behavior in fermentation. So, the molecular biology tools allowed us to know different strains inside the group of *Saccharomyces sensu stricto*.

Therefore in the transition from the 20<sup>th</sup> to 21<sup>st</sup> century, researchers dedicated to unveil the Brazilian fermentation processes on fuel-ethanol production and selected some yeast strains, belonging to *Saccharomyces sensu stricto* group, from different industrial units. From that, five strains (BG1; CAT1; FT858; PE2 and SA1) are being produced and commercialized to be used as starter yeast inoculum at the beginning of the harvest season period.

According to Andrietta et al. (2011) the names of these strains are related to their original industrial unit from which they were isolated. Thereby, BG1 strain correspond to a yeast strains isolated from Usina Barra Grande de Lençóis S/A; whereas CAT1 strain was isolated from Catanduva unit, belonging to Virgolino de Oliveira S/A Açúcar e Álcool Group; PE2 strain was selected from Pedra Agroindustrial S/A unit and SA1 strain was originally isolated from Usina Santa Adélia S/A unit. Differently from these four strains, FT858 strain



was named after its isolation by Fermentec Ltda, a biotechnology Brazilian company. All these industrial units, as well as Fermentec, are located in the state of São Paulo in Brazil.

Thus, Brazilian distilleries, in the early 2000s, started to use these selected industrial yeast strains in their fermentation processes.

In 2006, on the study presented by Basso et al. (2008), it was mentioned that 190 bioethanol plants among the 329 Brazilian distilleries were using industrial selected yeast strains.

In the last decade, our group compiled the information about the yeast strains used as inoculum to start up the alcoholic fermentation at the beginning of harvest season by 125 Brazilian industrial units, from 2011 to 2018, as shown in Figure 1.

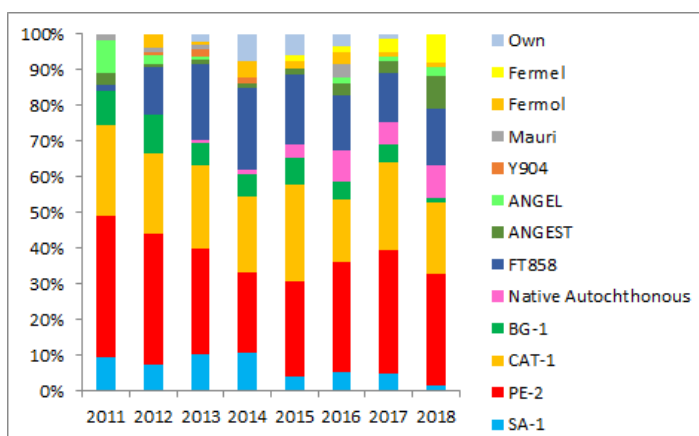


Fig.1 Historical use of starter yeasts strains in Brazilian fuel-ethanol production processes in the harvest season periods from 2011 to 2018. All the terms used to refer to the yeasts are abbreviations or commercial names, except to “Native autochthonous” and “Own”. The expression “own” yeast is used to refer to a mixture of yeasts stored at the end of one harvest period and used in the next harvest season period as inoculum, without any identification or characterization. All these information was sourced by personal communication with 125 the Brazilian distilleries during the period evaluated.

Figure 1 shows the historical use of yeast strains to start up the alcoholic fermentation in 125 Brazilian fuel-ethanol production processes, along the harvest season periods from 2011 to 2018. The names of the yeasts inside the figure refer to its commercial names. We referred to “Native autochthonous”, yeasts which were isolated from each industrial fermentation process, identified and characterized previously. The expression “Own” is used to refer to a mixture of yeasts stored at the end of one harvest period and used in the next harvest season period as inoculum without any identification or characterization. In this way “own” does not refer to one specific strain, it is a mixture of undetermined strains. All this information was based on personal communication with 125 the Brazilian distilleries

during the period evaluated.

As mentioned above, generally, the hard conditions in fermentation processes in the industrial context lead to a huge selective pressure over the microorganisms, especially yeasts, originating a driven natural selection of strains.

Despite of the continuous use of selected yeast strains in the industry, several researches related to yeasts population dynamics in Brazilian fermentation processes along the harvest season, have shown the replacement of these strains, as put forth by Steckelberg et al. (2017).

New approaches of yeast strains use have arisen from this deeper knowledge about the yeast strains population dynamics.

Recently, indigenous yeast strains, previously considered as a problem in the fermentation processes, once they replaced selected yeast strains during the harvest season period, were reclassified as native autochthonous yeast lineages with high potential to be used after identification and characterization analysis.

So the fermentation processes became a huge source of biodiversity and possible solutions to improve their own processes.

For this reason, in this study we used twenty yeast strains with three different profiles: 6 baker's yeast strains; 6 selected yeast strains and 7 native autochthonous yeast strains in order to evaluate, comparatively, their resistance profile under the action of 40 different essential oils. We also evaluated one yeast strain named CLE isolated from one Brazilian industrial unit more than 20 years ago, characterized, stored in the Bioprocess laboratory and used as a fermentation standard.

All the strains were previously evaluated considering their genetic identification in a sub specific level using molecular fingerprint tools. In the next session we will present the yeast strains differentiation.

## 4 | YEAST STRAINS DIFFERENTIATION

Our study involved twenty microorganisms belonging to *Saccharomyces sensu stricto* group, divided into three different classes: 1) baker's yeast strains, which were used exclusively in the beginnings but they are also used nowadays; 2) commercial yeast strains (named and described above as selected yeast) including ANGEL yeast strain, which is a Chinese strain popularly used in Brazil as inoculum and 3) native autochthonous yeast strains.

The baker's yeasts strains were isolated from baker's yeast samples commercially used in Brazil. Likewise, the commercially selected yeast strains were isolated from commercial yeast samples produced in large scale and commercialized in Brazil.

On the other hand, the native autochthonous yeast strains were isolated from yeast samples from fermentation processes in different industrial units in Brazil. The fuel-ethanol

production industrial plants which provided the samples are located in four Brazilian states: São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Tocantins, the former three belonging to the main Brazilian biofuel production axis.

The ARO and CVG strains were isolated from two different industrial units, located in Minas Gerais; whereas the SM strain and RV strain were isolated from two different industrial units located in São Paulo; SF and TFT strains were isolated from fermentation processes located in Mato Grosso do Sul and finally BPA strain were isolated from fuel-ethanol production industry located in Tocantins. All of these yeast strains were previously evaluated in fermentation assays by the Bioprocess Laboratory team at Unicamp and were classified as satisfactory or superior performance in fermentation tests.

To proceed the differentiation protocols, firstly all yeast strains were grown using spread-plating technique, in which a small sample is spread over the surface of an agar plate in order to evaluate the biotypes, i.e., we evaluated the morphology of discrete colonies formed across the surface of the WL Nutrient medium agar (WLN, DIFCO 242420).

After that, we used a streak-plating technique to check the purity of the culture of yeast. Then, single colonies, which are comprised of millions of cells growing in a cluster on an agar plate, were transferred to another plate using spread-plate technique. Thus, the pure microorganisms were grown in petri dishes with Potato Dextrose Agar medium (PDA, DIFCO 213400) to be submitted to DNA extraction protocol (BIDENNE et al., 1992 modified; OAKLEY-GUTOWSKI et al., 1992 modified; ARGUESO, et al. 2008).

All isolates were distinguished by electrophoretic karyotyping profile obtained from pulsed field gel electrophoresis (PFGE). This technique consists in the separation of intact chromosomal DNA according to its size on a gel matrix of agarose. According to the number and size of the chromosomes present in each strain, specific banding patterns were obtained.

In a different approach, considering conventional DNA electrophoresis which is able to separate molecules of up to 50 kilobases, PFGE is able to do the separation of large DNA molecules, as yeast chromosomes, which range from several hundred to several thousand kilobases (ZIMMERMAN; FOURNIER, 1996). This separation is possible because this technique uses an electric field that periodically changes direction in a gel matrix of agarose.

Unquestionably, nowadays there is an immense variety of molecular techniques for the identification of microorganisms. Nonetheless, not all of them are able to have sufficient sensitivity to distinguish some microorganisms at the sub-specific level, i.e., by distinguishing among different strains.

According to VILANOVA et al. (2007), PFGE has a greater discriminatory power when compared to mtDNA restriction analysis for *Saccharomyces cerevisiae* yeast clones. Therefore, this greater resolution in the power of differentiation among strains makes it better suited for the detection of genetic diversity in yeasts.

For this reason, we used PFGE to do the differentiation of all yeast strains. Below

we present the DNA electrophoretic profile for two groups of yeast strains evaluated: commercial selected yeast strains and native autochthonous yeast strains (Figure 2). The terms used to name commercially selected yeast strains were discussed above. The native autochthonous strains were named according to the protocol used in Bioprocess Laboratory, at Unicamp, which names yeast strains considering their original place of isolation.

The DNA electrophoretic profiles of all baker's yeast strains evaluated were presented by Kitaka et al. (2020) in the study "*Sturdiness of baker's yeast strains to natural bioactive compounds*". The expressions used to name the baker's yeast groups were established based on the commercial description: (ADY: Active dry baker's yeast; SDY Sweet dough baker's yeast; SY strong baker's yeast).

The Figure 2 presents the genomic DNA electrophoretic profile of all industrial yeast strains, which allows the differentiation among yeast strains belonging to *Saccharomyces sensu stricto* group. From the (A) to (F) were demonstrated the genomic DNA profiles of commercially selected yeast strains, whereas from (G) to (M) present DNA profiles of native autochthonous yeast strains and in (N) the DNA profile of CLE standard strain, stored in laboratory for more than 20 years.

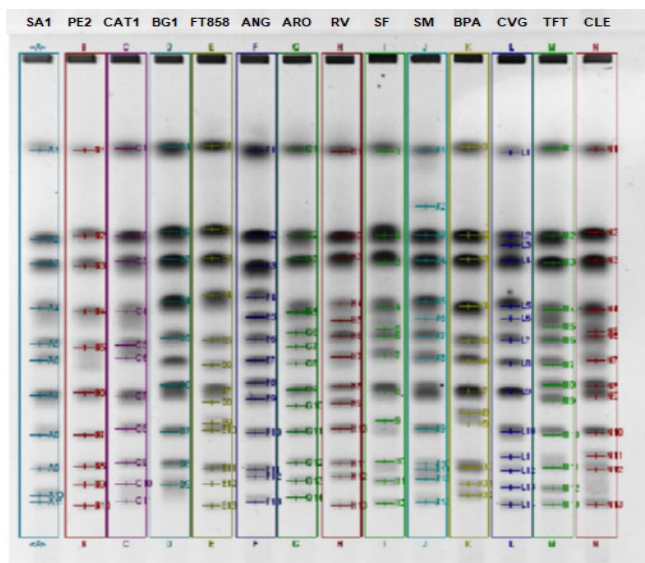


Figure 2: Genomic DNA electrophoretic profile of yeast strains. Differentiation among yeast strains (*Saccharomyces sensu stricto* group) obtained using PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) in agarose gel 0.8%. Image acquisition by UVP Vision Works LS system. (A) SA1 strain; (B) PE2 strain; (C) CAT1 strain; (D) BG1 strain; (E) FT858 strain; (F) ANG strain; (G) ARO strain; (H) RV strain; (I) SF strain; (J) SM strain; (K) BPA strain; (L) CVG strain; (M) TFT strain; (N) CLE strain.

After the molecular differentiation test using PFGE analysis, twenty strains were

established as different yeast strains. All of them were tried with 40 plant-derived essential oils. The subsequent sessions explain why evaluate industrial yeasts strains in the face of essential oils. They also summarize some findings from our studies with yeast strains' resistance to these compounds.

## 5 I WHY NATURAL PRODUCTS AND INDUSTRIAL YEAST STRAINS

As mentioned above, yeasts, particularly yeasts strains belonging to *Saccharomyces sensu stricto* group, are widely used in different industrial segments.

Fuel-ethanol production industry, as well as other industrial segments, has positioned itself in the context of a more modern approach, generating a demand for natural products solutions and the development of eco-friendly technologies.

Throughout the history of Brazilian fuel-ethanol production, this industrial segment has been continuously using antibiotics in order to control bacterial contamination in their fermentation processes. Some of these antibiotics are the same consumed by humans and are posing a serious problem, since the promiscuous use of antibiotics increases the selective pressure over antibiotic resistance genes. This selective pressure caused by this practice facilitates the transference antibiotic resistance genes to pathogenic organisms and explains the growing concern about the effects of the indiscriminate use of antibiotics in human health (ALLEN et al., 2010).

In addition, traces of these antibiotics may be found in ethanol byproducts. Dry yeast is sold as a source of protein for animal feed preparation. Brazil, as a leading exporter of this protein, faces the customary rejection of this product by the European Community. This is because of antibiotics traces which are found in dry yeasts (GORDON, 2009).

Therefore, the replacement of antibiotics' use in the fermentation processes for bioethanol production is paramount. Hence, the replacement should entail the use of substances that do not turn into harmful residue to the environment and, as a consequence, a hazard to human health.

Essential oils (EO) are considered an important natural source of substances with antimicrobial activity, some of them are discussed by Burt (2004) and Kitaka et al. (2019).

Besides the antimicrobial activity, the fact that some EO are used commercially in several industrial segments, as food industry, pharmaceutical and / or cosmetic, demonstrates interesting technological characteristics of essential oils, as they do not become harmful residues to the environment and human health (BAKKALI et al., 2008). Thus, these oils may become a solution to do this replacement.

These facts motivated the investigation of *Saccharomyces sensu stricto* resistance in the face of EO, as a screening evaluation test in yeasts, in order to develop a technology to serve as an alternative solution to replace antibiotics to control contamination in alcoholic fermentation processes.

## 6 I RESISTANCE OF YEAST STRAINS TO ESSENTIAL OILS

This session presents some concepts about plant-derived essential oils and summarizes some findings from our studies about the resistance of industrial yeast strains to these compounds.

According to Roller (2003), plants produce a range of antimicrobial compounds. Some of them are always present in the plants, while others are produced as a response against microorganisms and physical injuries. The production of these phytochemicals as a stress condition response to combat pathogenic infections is mentioned by several authors (THEIS; LERDAU, 2003). Inside of this phytochemicals group are the essential oils (EO).

Essential oils are a mixture of several compounds, with different chemical origin. Their composition varies and could include terpenes, alcohols, acids, esters, epoxides, aldehydes, ketones, amines and sulfides. These complex aromatic and volatile mixtures could be obtained from different plant materials such as leaves; flowers; buds; roots and barks (GUENTHER, 1948; BURT, 2004).

In this study, 40 plant-derived essential oils were used, which were described by Kitaka (2018; 2019). These essential oils were extracted from plants belonging to the Medicinal and Aromatic Plant Collection (CPMA) of Chemical, Biological and Agricultural Multidisciplinary Research Center (CPQBA) at University of Campinas (UNICAMP), in Brazil.

The resistance of the 20 different industrial yeast strains, previously identified and differentiated, was established considering their ability to grow in the face of different essential oils, in all concentrations evaluated.

The resistance was inferred from the growing ability considering the inhibitory effect of the essential oils (EOs) using the microdilution test and determining Minimal Inhibitory Concentration - MIC (NCCLS, 2002) for each of the 40 essential oils. The Figure 3 summarizes the results from the experiments with the 40 EOs in different concentrations, ranged from 2mg/mL to 1µg/mL in which we catalogue the resistance profiles of all yeast strains studied.

#EO	Scientific name	Baker's Yeast Strains						Industrial Yeast Strains															
		DYS	BMD	FMD	IMD	FFF	IMS	SA	PE	CAT	BG	FT858	ANGEL	ARO	RV	SF	SM	BPA	CVG	TFT	CLE		
		ADY	SDY																				LBY
1	<i>Aloysia griseasima</i>																						
2	<i>Aloysia triglypha</i>																						
3	<i>Artemisia annua</i>																						
4	<i>Vernonia curassavica</i>																						
5	<i>Cymbopogon winterianus</i>																						
6	<i>Lippia sidoides</i>																						
7	<i>Ocimum gratissimum</i>																						
8	<i>Cigarrum vulgare</i>																						
9	<i>Piper abutiloides</i>																						
10	<i>Piper aduncum</i>																						
11	<i>Thyctus vulgaris</i>																						
12	<i>Viola zizanioides</i>																						
13	<i>Audouinia subaraboides</i>																						
14	<i>Alpinia</i>																						
15	<i>Baccharis dracunculifolia</i>																						
16	<i>Celastrus paniculata</i>																						
17	<i>Cymbopogon citratus</i>																						
18	<i>Cymbopogon martinii</i>																						
19	<i>Cyperus articulatus</i>																						
20	<i>Eleonurus muticus</i>																						
21	<i>Cymbopogon ambrosioides</i>																						
22	<i>Eugenia uniflora</i>																						
23	<i>Lippia alba</i>																						
24	<i>Mentha silvestris</i>																						
25	<i>Mentha aquatica</i>																						
26	<i>Mentha piperita</i>																						
27	<i>Ocimum selloi</i>																						
28	<i>Panicum microphyllum</i>																						
29	<i>Panicum pennsylvanicum</i>																						
30	<i>Pimenta dioica</i>																						
31	<i>Schinus molle</i>																						
32	<i>Ruta graveolens</i>																						
33	<i>Tagetes patula</i>																						
34	<i>Piper cubense</i>																						
35	<i>Piper cernuum</i>																						
36	<i>Piper marginatum</i>																						
37	<i>Piper mollicomum</i>																						
38	<i>Piper ovatum</i>																						
39	<i>Piper nigrum</i>																						
40	<i>Plectonocarpa umbellata</i>																						

Figure 3 Minimal inhibitory concentration (MIC) - Effect of plant-derived essential oil on yeast strains growth

Considering all of the 20 yeast strains, they presented an average resistance of 57.7% to all oils tested. The Figure 4 illustrates the resistance profile of all the yeast strains evaluated. In (A) the profile of strains referred as baker's yeast strains shows an average resistance of 51.7%, the worst in comparison to the other groups of yeast strains. The lowest resistance inside this group achieved 45% in DYS strain. The comparative study in this group of yeast strains were discussed by Kitaka et al. (2020).

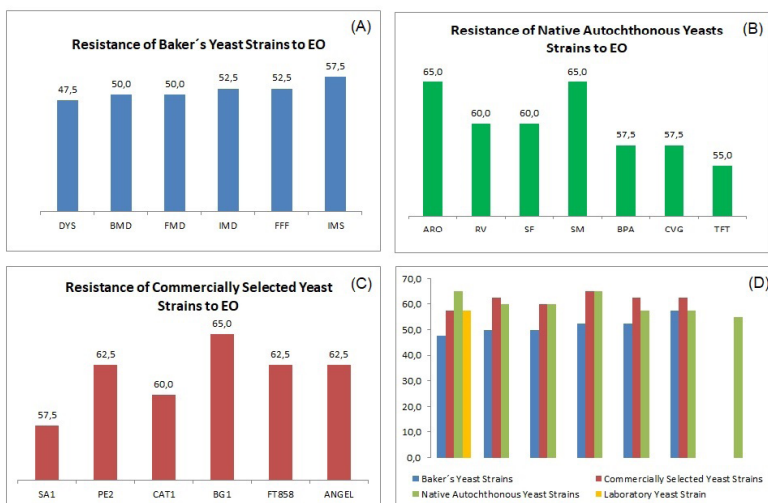


Figure 4: (A) Resistance of Baker's Yeast Strains to EO; (B) Resistance of Native Autochthonous Yeast Strains to EO; (C) Resistance of Commercially Selected Yeast Strains to EO; (D) Comparison of resistance profile to EO among all yeast strains evaluated.

Contrasting the baker's yeast strains group, for the other two groups, (commercially selected yeast strains (C) and native autochthonous yeasts strains (B)), there was no convergence among resistance or susceptibility profile, comparing the strains inside each group. For both groups the average resistance was similar, 61.7% and 60.0% respectively.

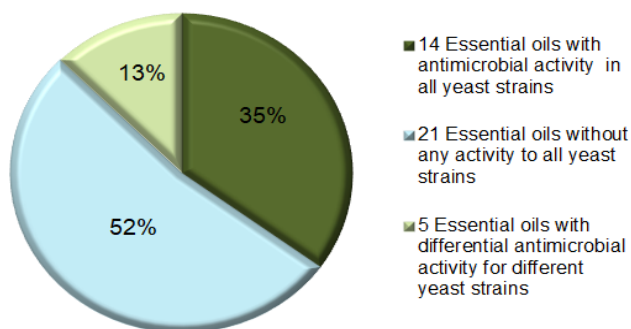
In the native autochthonous yeasts strains group (B), we should highlight ARO strain (isolated from fermentation process located in Minas Gerais) and SM strain (isolated from fermentation process located in São Paulo), both presenting 65% of resistance to all essential oils evaluated. Inside this group, the strain with the worst resistance performance was TFT, isolated from fermentation process located in Mato Grosso do Sul, which is resistant to 55% of all EO studied.

Similarly, in the group of commercially selected yeast strains (C), there was no uniformity with the resistance profile of the strains, although all of them have shown higher resistance profile. In this group BG1 strain should be highlighted with 65% of resistance, followed by PE2, ANGEL and FT858, all with 62.5% of resistance.

In Figure 4 (D) it is possible to notice the resistance performance of one laboratory yeast strain, named CLE. It was resistant to 57.5% of all essential oils tested. Despite of the fact that this yeast strain has been stored in laboratory conditions for more than 20 years, it seems to have kept, in general, the pattern of resistance observed in native yeast strains, since it was also isolated at one Brazilian industrial unit and characterized (in the same way of native autochthonous yeast strains).

Taking into consideration the activity of all EOs over yeast strains, as shown in the pie chart (Figure 5), it is possible to notice that, for 52% of the EO, there was no antimicrobial activity for all yeast strains tested.

Contrastingly, the remaining 48% EOs have shown activity on the yeast strains. Among these EOs, 35% presented activity for all strains while 13% acted differentially, presenting activity for certain strains.



**Figure 5: Antimicrobial activity of essential oils in industrial yeast strains**



As the baker's yeast strains' robustness were previously discussed by Kitaka et al. (2020), herein, we will discuss the effect of the essential oils in the other strains, referred to as industrial strains. All these strains were affected by EO of *Aloysia tryphylla*; *Cymbopogon winterianus*; *Lippia sidoides*; *Ocimum gratissimum*; *Origanum vulgari*; *Cymbopogon citratus*; *Cymbopogon martini*; *Cyperus articulatus*; *Elyonurus muticus*; *Dysphania ambrosioides*; *Eugenia uniflora*; *Mentha aquatica* and *Pimenta dióica*.

Distinctly, most of the industrial yeast strains have presented slight inhibitory growth pattern in the face of *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* and *Tagetes patula* essential oils, in which concentrations can reach 0,5mg/mL.

The EOs under which all the industrial yeasts strains have shown resistance, were presented by Kitaka et al. (2018) and were screened to be evaluated in other microorganisms isolated from fuel-ethanol fermentation processes.

Comparison among the three groups of yeast strains shows that baker's yeast group presented the lowest resistance and the major uniformity in the resistance profile.

Both selected yeast group and native autochthonous yeast strains group presented strains highly resistant to most of the essential oils. As the strains inhabiting the fermentation processes are mainly composed of selected yeast strains and native autochthonous yeast strains, the use of some EOs could be a possibility, considering the previous screening, as we showed here.

## 7 | FINAL CONSIDERATIONS

This chapter provided the characterization of several yeast strains used as inoculum in Brazilian fermentation processes in the fuel-ethanol production industry. These strains include: baker's yeast strains; commercially selected yeast strains and native autochthonous yeasts. The characterization involved the genetic differentiation among strains and the establishment of resistance profile using essential oils obtained from native Brazilian plants and exotic ones.

However there are uncountable studies using essential oils as potential antimicrobials and antioxidant, extremely few show their application in processes using *Saccharomyces sensu stricto* as fermentation platforms.

This chapter discussed both the resistance of different yeast strains groups in the face of several EOs and the comparison among them.

Overall, the results of yeast strains resistance presented a convergence, i.e., the same EO inhibitory effect was observed in different strains for one specific essential oil.

Although there is not a general convergence of results regarding the resistance of all the strains to all the EO, it was possible to observe the convergence of findings in the resistant profile by the strains against one specific EO.

Furthermore, for some EO, the results of yeast strains resistance point toward a

similar pattern. This similarity might allow a prediction of the effect of EOs extracted from plants belonging to the same plant family or genus. Some convergent examples are related to the sensitivity profile of yeast strains in the face of the essential oils in which there was a high harmful effect.

One example is observed in the inhibitory effect of EOs 17 and 18, extracted from plants belonging to the *Cymbopogon* spp. genus (Poaceae family) which presented similar harmful effects against all the yeast strains.

In other cases, as *Elyonurus muticus*; (20); *Dysphania ambrosioides* (21) and *Eugenia uniflora* (22), although essential oils were not extracted from plants belonging to the same family or genus, the harmful effect in one specific strain could give us a clue about the higher toxicity effect for all the industrial yeast strains.

In short, not only the findings of resistance in industrial yeast strains but also the essential oils inhibitory effect has implications on technological applications for industrial segments that use *Saccharomyces sensu stricto* strains. Finally, these results open new perspectives for applications of bioactives as plant-derived essential oils, especially in the industrial context.

## ACKNOWLEDGMENT

CAPES /PROEX; CPQBA/UNICAMP for financial support.

Genetics and Molecular Biology Graduate Program at Biology Institute, UNICAMP.

Bioprocess, Microbiology, Agrotechnology, Organic Chemistry/ Pharmaceuticals and Microbial Resources Divisions at CPQBA Research Center teams by the technical support.

## REFERENCES

ALBA-LOIS, I. SEGAL- KISCHINEVZKY, C. Yeast fermentation and the making beer and wine. Nature Education, v3, n.9, p17, 2010.

ALLEN, H.K.; DONATO, J.; WANG, H.H.; CLOUD-HANSEN, K.A.; DAVIES, J. HANDELSMAN, J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. Nat. Rev. Microbiol.. 8:251-259. doi.10.1038/nrmicro2312. 2010.

AMORIM, H.V.; LEÃO R.M. Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia. 1ª ed. Piracicaba: Fermentec Publicações Editora Comercio de Livros Ltda, v.3000, 433p., 2005.

AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; OLIVEIRA, J.V.C.; BUCKERIDGE, M.; GOLDMAN, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.91, n.5, p.1267-1275, 2011.

ANDRIETTA, M.G.S; ANDRIETTA, S.R.; STUPIELLO, E.N.A. Bioethanol – What has Brazil learned about yeasts inhabiting the ethanol production processes from sugar cane? 2011 Biofuel Production Recent Developments and Prospects, Dr Marco Aurélio dos Santos Bernardes (Ed.) ISBN:978-953-307-478-8, In-Tech.E-book (PDF) ISBN 978-953-51-4435-9. DOI:10.5772/959. 2011.

ARGUESO, J.L.; WESTMORELAND, J.; MIECZKOWSKI, P.A.; GAWEL, M.; PETES, T.D.; RESNICK, M.A. Double-strand breaks associated with repetitive DNA can reshape the genome. **PNAS** 105 (33) 11845-11850; 2008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804529105>

ARGUESO, J.L.; CARAZOLLE, M.F.; MIECZKOWSKI, P.A.; DUARTE, F.M.; NETTO, O.V.C.; MISSAWA, S.K.; GALZERANI, F.; COSTA, G.G.L.; VIDAL, R.O.; NORONHA, M.F.; DOMINSKA, M.; ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; CUNHA, A.F.; GOMES, L.H.; TAVARES, F.C.; ALCARDE, A.R.; DIETRICH, F.S. MCCUSKER, J.H.; PETES, T.D. PEREIRA, G.A.C. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. **Genome Research** 19:2258-2270. 2009

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oil – A review. **Food and Chemical Toxicology**, 46, p.446-475, 2008.

BARNETT, J. A history of research on yeasts: Work by chemistry and biologists, 1789-1850. **Yeast** 14:1439-145, 1998.

BARNETT, J. A history of research on yeasts: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850-1880. **Yeast** 16:755-771, 2000.

BARNETT, J.; LICHTENTHALER, F. A history of research on yeasts: Emil Fischer, Eduard Buchner and their contemporaries, 1880-1900. **Yeast** 18:363-388, 2001.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M.L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research** 8: 1155-1163, 2008.

BASSO, L.C. PAULILLO, S.C.L. RODRIGUES, D.A. BASSO, T.O. AMORIM, H.V. WALKER, G.M. Aluminium toxicity toward yeast fermentation and protective effect of magnesium. International Congress on Yeasts – Yeasts in: **Science and Biotechnology. The Quest for Sustainable Development**, Book of Abstracts, Rio de Janeiro, p.PB-14, 2004.

BIDENNE, C.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; VEZINHET, F. Analysis of the chromosomal DNA polymorphisms of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr Genet** 22, 1-7. 1992.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.3, p.223-253, 2004.

CHAMBERS, P.J.; PRETORIUS, I.S. Fermentation Knowledge: the history of winemaking, science and yeast research. **European Molecular Biology Organization Reports**. Vol.11 (12), p.914-920, 2010.

GORDON, C. R. 2009 FDA Sampling detects Antibiotics Residues in Ethanol Distillers Products. **National Grain and Feed Association Newsletter**, January 29, 2009. Disponível em <http://www.ngfa.org/files/misc/News1-29.pdf> (Acessado em 15 Outubro 2016).

GU, Z.; OLIVER, S. Yeasts as models in evolutionary biology. **Genome Biology** London, v.10, p.304, 2009.

GUENTHER, E. The essential Oils D. Van Nostrand, New York. 1948

KITAKA, Patrícia Regina; ANDRIETTA, Maria da Graça Stupiello; MERZEL, Valéria Maia; DUARTE, Marta Cristina Teixeira; FIGUEIRA, Glyn Mara. **Composições e seu uso**. Depositante: Universidade

Estadual de Campinas. Procurador: Ciro de la Cerda BR nº1020180168045. Depósito 16 de agosto de 2018.

KITAKA, P.R.; DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; STECKELBERG, C. DELARMELENA, C. OLIVEIRA, V.M.; ANDRIETTA, M.G.S. Potential use of essential oils in baker's yeast. In **Pesquisa na Cadeia de Plantas Aromáticas**. Ponta Grossa: Atena Editora, 2019. Cap.1. p.1-12. DOI 10.22533/at.ed.6219130091.

KITAKA, P.R.; FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M.C.T.; STECKELBERG, C. DELARMELENA, C. OLIVEIRA, V.M.; ANDRIETTA, M.G.S. Sturdiness of baker's yeasts strains to natural bioactive compounds. In **Pesquisa Científica e Tecnológica em Microbiologia 2**. Ponta Grossa: Atena Editora, 2020. Cap.14. p.143-153. DOI 10.22533/at.ed.39420220114.

OAKLEY-GUTOWSKI, K.M., HAWTHORNE, D.B., AND KAVANAGH, T.E. Application of chromosome fingerprinting to the differentiation of brewing yeasts. **Am. Soc. Brew. Chem.** v.50, p. 48–52, 1992.

NCCLS 2002. M27-A2. In National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: proposed standard. 2002.

ROLLER, S. Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods. Cambridge: Woodhead Publishing, Limited. 2003.

STECKELBERG, C. Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas. 2001. Tese (Doutorado em Engenharia Química). [*Characterization of yeasts from alcoholic fermentation processes using cell composition and attributes and kinetic characteristics*. Thesis]. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

STECKELBERG, C.; KITAKA, P.R.; ANDRIETTA, S.R.; ANDRIETTA, M.G.S. Dominance and Persistence of PE strains (*Saccharomyces Sensu Stricto*) in Brazilian Bioethanol Fermentation Tanks (One Unit Four Seasons). **International Journal of New Technology and Research** 3 (6) 2017.

STRATFORD M. Food and Beverage Spoilage Yeasts. In: Querol A., Fleet G. (eds) **Yeasts in Food and Beverages**. Springer, Berlin, Heidelberg 2006.

THEIS, N.; LERDAU, M. The Evolution of Function in Plant Secondary Metabolites. **International Journal of Plant Sciences** 164(S3):93-102, 2003.

TOSETTO, G.M. Comportamento de linhagens industriais de *Saccharomyces* frente a compostos inibitórios presentes no melaço de cana-de-açúcar na produção de bioetanol. 2008 Tese (Doutorado em Engenharia Química). [*Behavior os Saccharomyces industrial strains before inhibiting compounds present in sugarcane molasses in bioethanol production*. Thesis]. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

UDOP - UNIÃO NACIONAL DA BIOENERGIA Produção Brasileira de Etanol. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Secretaria de Política Agrícola - Departamento de Comercialização e Abastecimento DCAA / SPAE/MAPA

Disponível em: [https://www.udop.com.br/producao-brasileira-arquivos/15/12ago20\\_producao\\_brasileira\\_etanol.pdf](https://www.udop.com.br/producao-brasileira-arquivos/15/12ago20_producao_brasileira_etanol.pdf), 2020. Acessado em 25/08/2020.

UNICA - UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA DE AÇÚCAR (2019) Produção de etanol total na Safra2019/2020. Disponível em: <https://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.%20CPB%20CRN%20CCE%20CPI%20CMA%20CTO%20CPA%20CAP%20CRO%20CAM%20CAC%20CRR,2019>. Acessado em 25/08/2020.

VILANOVA, M.; ZAMUZ, S.; MASA, A.; SIEIRO, C. Evaluation of PFGE and mtDNA restriction analysis methods to detect genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated to *Vitis Vinifera* J. **Int. Sci. Vigne Vin**, 41, n°3, n°3, 155-159, 2007.

ZIMMERMANN M., FOURNIER P. Electrophoretic Karyotyping of Yeasts. In: **Nonconventional Yeasts in Biotechnology**. Springer, Berlin, Heidelberg 1996 DOI [https://doi.org/10.1007/978-3-642-79856-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-79856-6_3)

## INVESTIGAÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE ENZIMAS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO

Data de aceite: 01/10/2020

Data de submissão: 02/10/2020

### Layne Even Borges de Souza

Faculdade Estácio do Amazonas  
Manaus – Amazonas  
<http://lattes.cnpq.br/7100762298589923>

### Leidiana Pinto da Costa

Faculdade Estácio do Amazonas  
Manaus – Amazonas  
<http://lattes.cnpq.br/1294773075176577>

### Rafael Cardoso Bastos

Faculdade Estácio do Amazonas  
Manaus – Amazonas  
<http://lattes.cnpq.br/6737955158182926>

### Thayana Cruz de Souza

Faculdade Estácio do Amazonas  
Manaus – Amazonas  
<http://lattes.cnpq.br/1915511415927481>

**RESUMO:** A utilização de microrganismos como fontes produtoras de enzimas tem se mostrado promissora, pois estes compõem um dos maiores recursos genéticos disponíveis no planeta. Considerando o avanço industrial global crescente e a demanda por fontes de produção de qualidade e baixo custo, a investigação de fungos filamentosos no processo de produção de enzimas se faz necessária e pode contribuir com o desenvolvimento e expansão de produtos biotecnológicos, especialmente na região Amazônica, onde, apesar da sua biodiversidade,

ainda tem estes recursos pouco explorados. O presente estudo teve como objetivo investigar a capacidade de fungos filamentosos para a produção de enzimas de interesse industrial e biotecnológico: proteases, amilases, celulasas e lipases. Para isto, foram selecionados oito fungos da Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM) Fiocruz – AM: CFAM 0027 *Aspergillus oryzae*, CFAM 234 *Aspergillus sp.*, CFAM 959 *A. subolivaceo*, CFAM 39 *Penicillium janthinellum*, CFAM 59 *P. fellutanum*, CFAM 462 *Penicillium sp.*, CFAM 592 e CFAM 47 *P. citrinum*. As culturas foram reativadas em meio de cultura Ágar Sabouraud (SAB). A obtenção dos extratos enzimáticos foi feita por fermentação submersa durante 7 dias em solução de Manachini suplementado com 0,5% do substrato indutor para cada enzima, sendo: gelatina para protease, amido para amilase, CMC (carboximetil-celulase) para celulase e Tween 80 para lipase. Para os testes enzimáticos, utilizou-se o método de *cup-plate*. Diante disso, observou-se que todos os microrganismos foram capazes de produzir pelo menos três das enzimas estudadas, enquanto que duas espécies apresentaram atividade para todas as enzimas avaliadas: CFAM 47 *P. citrinum* e CFAM 59 *P. fellutanum*. Entre os isolados, 37,5% revelaram resultados positivos para protease, 100% para amilase e lipase, e 87,5% para celulase. Desta forma, os resultados obtidos podem ser considerados promissores, uma vez que demonstram a potencialidade da aplicação biotecnológica de fungos da Amazônia em diferentes setores da indústria.

**PALAVRAS - CHAVE:** amilase; celulase; fungos; lipase; protease

## INVESTIGATION OF FUNGI PRODUCERS OF ENZYMES OF BIOTECHNOLOGICAL INTEREST

**ABSTRACT:** The use of microorganisms as enzyme-producing sources has shown promise, as they make up one of the largest genetic resources available on the planet. Considering the increasing global industrial advance and the demand for quality and low-cost production sources, the investigation of filamentous fungi in the enzyme production process is necessary and can contribute to the development and expansion of biotechnological products, especially in the Amazon region, where, despite its biodiversity, it still has these little explored resources. The present study aimed to investigate the capacity of filamentous fungi for the production of enzymes of industrial and biotechnological interest: proteases, amylases, cellulases and lipases. For this, eight fungi from the Amazon Fungi Collection (CFAM) Fiocruz - AM were selected: CFAM 0027 *Aspergillus oryzae*, CFAM 234 *Aspergillus sp.*, CFAM 959 *A. subolivaceo*, CFAM 39 *Penicillium janthinellum*, CFAM 59 *P. fellutanum*, CFAM 462 *Penicillium sp.*, CFAM 592 and CFAM 47 *P. citrinum*. The cultures were reactivated in Ágar Saboraud (SAB) culture medium. The enzymatic extracts were obtained by submerged fermentation for 7 days in Manachini's solution supplemented with 0.5% of the inducing substrate for each enzyme: gelatin for protease, starch for amylase, CMC (carboxymethyl cellulase) for cellulase and Tween 80 for lipase. For enzymatic tests, the *cup-plate* method was used. Therefore, it was observed that all microorganisms were able to produce at least three of the studied enzymes, while two species showed activity for all evaluated enzymes: CFAM 47 *P. citrinum* and CFAM 59 *P. fellutanum*. Among the isolates, 37.5% showed positive results for protease, 100% for amylase and lipase, and 87.5% for cellulase. In this way, the results obtained can be considered promising, since they demonstrate the potential of biotechnological application of fungi from the Amazon in different sectors of the industry.

**KEYWORDS:** amylase; cellulase; fungi; lipase; protease

### 1 | INTRODUÇÃO

O termo enzima foi empregado pela primeira vez pelo fisiologista alemão Wilhelm Kuhne em 1878 para descrever a atividade fermentativa em leveduras (Food Ingredients Brasil, 2011). Estas podem ser definidas como moléculas orgânicas de natureza proteica (com exceção das ribozimas), que atuam como catalisadores e aceleram a velocidade dos processos químicos, sem alterar a sua composição (Fernandes et al., 2010). Na ausência das enzimas, os processos biológicos seriam extremamente lentos e o fornecimento de produtos para o metabolismo seria insuficiente para a sua demanda (Leopoldo, 2009).

As enzimas são divididas por grupos, em conformidade com o tipo de reação química a ser catalisada. As oxirredutases promovem reações de oxidação-redução ou transferência de elétrons; as transferases atuam na transferência de grupos funcionais como amina e fosfato; as hidrolases promovem a hidrólise e ligação covalente; as liases atuam na quebra de ligações covalentes; as isomerases atuam nas reações de interconversão entre isômeros óticos ou geométricos e as ligases promovem a formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas pré-existentes (Coelho et al., 2008).

Dois métodos podem ser utilizados para a produção de enzimas, um deles é conduzido em meio líquido, chamado de Fermentação submersa (FSm) e outro em meio sólido, a Fermentação em estado sólido (FES). A escolha do processo fermentativo deve levar em consideração o ambiente físico ao qual o microrganismo está habituado (Oliveira et al., 2013). A Fermentação Submersa consiste na solubilização dos nutrientes em água livre para a fermentação do microrganismo, com controle de agitação, temperatura e pH. Propicia melhores condições de crescimento para bactérias e leveduras, devido a sua facilidade em absorver nutrientes neste estado. Já a Fermentação em estado sólido define o cultivo de microrganismos em um substrato sólido, isento de água livre e com baixa umidade. Nestas condições, o crescimento de fungos é mais eficiente (Couto e Sanromán, 2006).

As enzimas podem ser obtidas a partir de fontes vegetais, animais ou de microrganismos e aplicadas em diversos processos industriais, como nas indústrias farmacêutica, têxtil, alimentícia e também na medicina (Singhania et al., 2009). Dentre as principais enzimas de interesse comercial, podem ser destacadas as amilases, que catalisam a hidrólise da amilopectina, da amilose e do glicogênio e são utilizadas na produção de pães, cervejas e xaropes (Fernandes, 2007); as proteases, que são enzimas que promovem a quebra das ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas e são aplicadas na produção de queijos e fabricação de detergentes (Rao et al., 1998); as celulases, que catalisam a hidrólise da celulose e são utilizadas na liquefação de frutas para a produção de sucos (Castro e Pereira Jr., 2010); e as lipases, que tem como função catalisar a hidrólise de triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos livres e são aplicadas em biotecnologia para realçar o sabor e o aroma em produtos como o queijo (Hasan et al., 2006).

Atualmente, a aplicação de enzimas industriais representa cerca de 60% do mercado mundial de enzimas. As indústrias de alimentos, rações e detergentes são as maiores responsáveis por essa demanda, gerando cerca de U\$ 5 bilhões para a economia global em 2020 (Monteiro e do Nascimento Silva, 2009; Souza, 2015; EMBRAPA, 2017).

A crescente demanda por enzimas para a aplicação industrial motivou a busca por novas linhagens de fungos e bactérias capazes de produzir essas moléculas (Silva, 2018). A utilização de fungos filamentosos como fontes produtoras de enzimas tem se mostrado promissora, pois estes microrganismos compõem um dos maiores recursos genéticos disponíveis no planeta (Oyelekeet al., 2010). Além de serem facilmente adaptáveis a variados ambientes e condições adversas, podem ser clonados e reproduzidos em larga escala e são capazes de produzir um grande número de metabólitos (Orlandelli, et al., 2012). Algumas espécies possibilitam a produção de enzimas diversificadas, muitas das quais podem ser utilizadas em biotecnologia (Pereira e de Freitas, 2012).

Considerando os avanços industriais globais crescentes e a demanda por fontes de produção de qualidade e de baixo custo, a avaliação de microrganismos no processo de



produção de enzimas de interesse se faz necessária e pode contribuir com o desenvolvimento e expansão de produtos biotecnológicos, especialmente na região Amazônica, onde, apesar da sua biodiversidade, ainda tem estes recursos pouco explorados.

O presente estudo teve como objetivo investigar a capacidade de fungos filamentosos para a produção de enzimas de interesse industrial e biotecnológico.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Microrganismos

Os microrganismos foram obtidos da Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM) Fiocruz – AM. Para a realização dos experimentos foram selecionados oito fungos filamentosos: CFAM 0027 *Aspergillus oryzae*, CFAM 234 *Aspergillus sp.*, CFAM 959 *Aspergillus subolivaceo*, CFAM 39 *Penicillium janthinellum*, CFAM 59 *Penicillium fellutanum*, CFAM 462 *Penicillium sp.* e CFAM 592 e CFAM 47 *Penicillium citrinum*.

### 2.2 Reativação das Culturas

As culturas foram reativadas em meio de cultura Ágar Saboraud (SAB) em placas de Petri ( $\varnothing = 100 \text{ mm} \times 15 \text{ mm}$ ) e os cultivos foram mantidos a  $25^\circ \text{C}$  por 7 dias (cultura estoque).

### 2.3 Condições de Cultivo para Obtenção das Enzimas

A obtenção dos extratos enzimáticos foi feita por fermentação submersa. A partir das culturas-estoque foram feitos 3 plugs de 8 mm e transferidos para frascos Erlenmeyer contendo 30 ml de solução de Manachini, suplementado com 0,5% do substrato indutor de cada enzima, sendo eles: amido para amilase, gelatina para protease, carboximetilcelulose (CMC) para celulase e Tween 80 para lipase (Teixeira et al., 2011). Os cultivos foram submetidos a agitação constante a 150 rpm, por 7 dias à  $28^\circ \text{C}$ . O extrato foi separado da biomassa por filtração à vácuo utilizando papel de filtro Whatman nº1 e em seguida membrana filtrante ( $0,45 \mu\text{m}$ ). Nos extratos brutos recuperados foram determinadas as atividades enzimáticas.

### 2.4 Testes Enzimáticos

O método utilizado foi de *cup-plate*, o qual consistiu na confecção de 3 poços em cada placa com os meios de cultivo respectivos para cada enzima. Em cada poço, foram aplicados 150  $\mu\text{l}$  de cada extrato obtido da filtração, em seguida eles foram identificados e incubados à  $28^\circ \text{C}$  por 24 horas.

A atividade enzimática foi determinada a partir da média dos diâmetros (mm) dos halos de degradação que se formaram ao redor dos poços.

## 2.4.1 Revelação da Atividade Enzimática

### 2.4.1.1. Protease

A atividade proteolítica foi observada pela formação de um halo translúcido ao redor de cada *cup-plate*.

### 2.4.1.2. Lipase

A presença de lipases ocasionou a formação de pequenos cristais ao redor de cada *cup-plate*.

### 2.4.1.3. Amilase

Para a constatação dos halos de amilase foi utilizado vapor de iodo como reagente. A placa contendo o extrato enzimático foi vertida sobre o iodo ressublimado. A presença das enzimas amilolíticas pôde ser avaliada pela coloração azulada no meio sólido e a ação enzimática foi observada pela formação dos halos translúcidos ao redor de cada *cup-plate*.

### 2.4.1.4. Celulase

A revelação da atividade de celulase foi realizada com o auxílio de uma solução de vermelho do Congo a 0,1 % (p/v) e NaCl 1M. Primeiramente foi adicionada a solução de vermelho do Congo de modo a cobrir toda a superfície do meio, por 20 minutos. Em seguida a solução foi descartada e adicionada a solução de NaCl 1M, por mais 20 minutos. Após o descarte da solução de NaCl 1M, a presença das enzimas celulolíticas foi observada pela coloração vermelha em meio sólido e a atividade enzimática pela formação do halo alaranjado ao redor de cada *cup-plate*.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados quatro testes enzimáticos com os oito fungos selecionados a partir do extrato das culturas obtidos por fermentação submersa. Os resultados das atividades enzimáticas estão apresentados na Tabela 1. Observou-se que todos os microrganismos foram capazes de produzir pelo menos três das enzimas estudadas, enquanto duas espécies apresentaram atividade para todas as enzimas avaliadas: CFAM 47 *P. citrinum* e CFAM 59 *P. fellutanum*.

Fungos isolados	Enzimas			
	Protease	Lipase	Amilase	Celulase
0027 <i>Aspergillus oryzae</i>	-	20,0	17,3	22,3
234 <i>Aspergillus sp.</i>	-	18,3	18,3	19,0
959 <i>Aspergillus subolivaceo</i>	15,3	20,3	14,3	-
47 <i>Penicillium citrinum</i>	12,0	20,7	14,3	17,0
39 <i>Penicillium janthinellum</i>	-	17,7	17,3	18,3
59 <i>Penicillium fellutanum</i>	14,3	18,7	10,3	16,0
462 <i>Penicillium sp.</i>	-	19,7	17,0	18,7
592 <i>Penicillium citrinum</i>	-	18,7	13,3	18,0

Tabela 1. Média dos tamanhos dos halos (mm) em meio sólido.

Entre os isolados, 37,5% revelaram resultados positivos para protease. A Figura 2 apresenta o resultado obtido da degradação do substrato pela atividade proteolítica, dos extratos dos fungos CFAM 59 *P. fellutanum* e CFAM 47 *P. citrinum*.

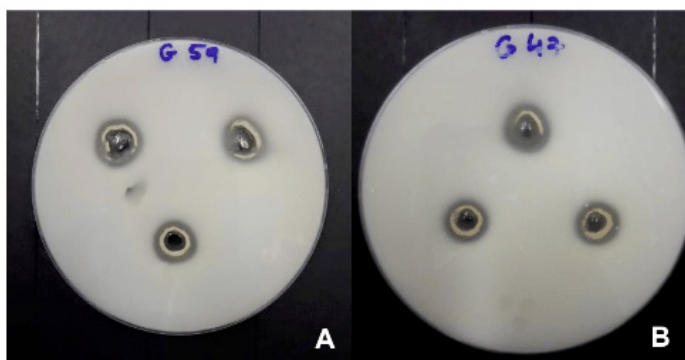


Figura 2. Atividade proteolítica de CFAM 59 *P. fellutanum* (A) e CFAM 47 *P. citrinum* (B).

A capacidade de produção de enzimas proteolíticas por *P. fellutanum* e *P. citrinum* pôde ser observada por Rodarte (2005). Estudos realizados por Chrzanowska et al. (1993) e Durand-Poussereau e Fevre (1996) também corroboram com a literatura na eficiente secreção de proteases pelo gênero *Penicillium*. Quanto aos isolados CFAM 47 e CFAM 592, embora correspondam à mesma espécie (*P. citrinum*), apresentaram resultados diferentes, sendo 47 positivo para protease e 592 negativo. Isto significa que a produção de proteases é específica para cada isolado e não para determinada espécie, o que pode ou não ser ativado dependendo do meio de cultivo. Essas divergências reafirmam que a produção de proteases depende diretamente da sua linhagem, conforme descrito por outros autores

(Ellaiah et al., 2002; Koka e Weimer, 2000; Agrawal et al., 2004 e Germano et al., 2003). As enzimas proteolíticas obtidas de espécies dos gêneros *A. sp.* e *P. sp.* são utilizadas para o processo de coagulação do leite na fabricação de queijos e na hidrólise de substâncias de sopas e alimentos salgados (Food ingredients Brasil, 2011).

A atividade amilolítica pôde ser observada em 100% dos isolados. A Figura 3 apresenta os maiores halos, produzidos pelo fungo CFAM 234 *Aspergillus. sp.*

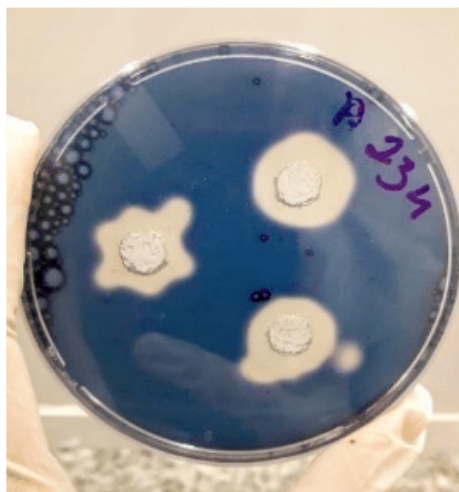


Figura 3. Atividade amilolítica de CFAM 234 *A. sp.*

A frequência dos microrganismos isolados produtores de amilases foi semelhante à encontrada por Saleem e Ebrahim (2014). Os resultados desse estudo são superiores aos encontrados por Lima et al. (2015) que testaram a produção de amilases com isolados de algumas espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus* em diferentes concentrações. Sob concentração de 0,5% de amido, a produção máxima dos halos de amilase para *Aspergillus* foi de 10,0 mm e para *Penicillium* 6,0 mm. Conforme Amin et al. (2011), a concentração do substrato é proporcional à atividade enzimática. *A. oryzae* é amplamente utilizado na indústria alimentícia, para a produção de alimentos como molho de soja e enzimas comerciais como  $\alpha$ -amilase (Kammoun, et al., 2008).

Com relação aos resultados obtidos para lipase, 100% dos isolados foram produtores da enzima. O fungo que produziu os maiores halos foi CFAM 959 *A. subolivaceo*, representado pela Figura 4.

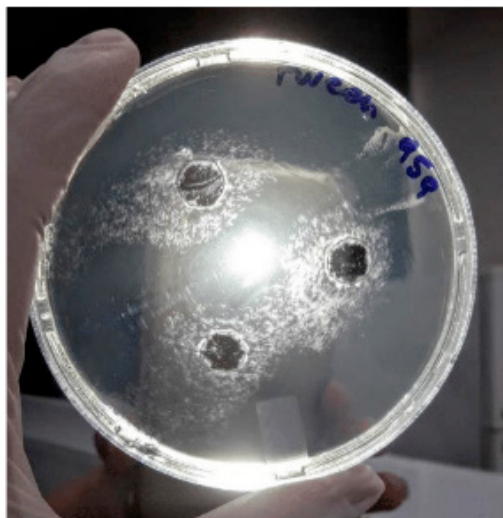


Figura 4. Atividade lipolítica de CFAM 959 *A. subolivaceo*.

Sharma et al. (2001) citam diversas cepas fúngicas como boas produtoras de lipases, entre elas, *Aspergillus* e *Penicillium*. Outros autores corroboram com a eficiência destes dois microrganismos como secretores de enzimas lipolíticas (Rapp e Backhaus, 1992; Carvalho et al., 2005; Hasan, et al., 2006; Castro, 2010; Mendes, 2005). Roveda et al. (2010) avaliaram a produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados a partir de efluentes de laticínios e concluíram que os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* tiveram as maiores atividades enzimáticas. No presente estudo, os isolados CFAM 0027 *A. oryzae*; CFAM 959 *A. subolivaceo* e CFAM 47 *P. citrinum* obtiveram atividades lipolíticas acima do índice descrito por Stamford et al. (1998) os quais determinaram que, para um fungo filamentoso ser considerado um bom produtor de enzimas, o valor da atividade enzimática deve ser igual ou maior a 2,0. Assim, este estudo corrobora com o potencial promissor da utilização de espécies dos gêneros de *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.* para a produção e aplicação biotecnológica das enzimas de interesse, tendo função relevante em setores industriais como alimentos e de cosméticos (Hasan et al., 2006).

No que se refere às atividades celulolíticas, 87,5% dos fungos foram capazes de secretar celulase quando cultivados em meio líquido. A Figura 5 representa a atividade enzimática produzida pelo fungo CFAM 0027 *A. oryzae* e apresenta os maiores halos.

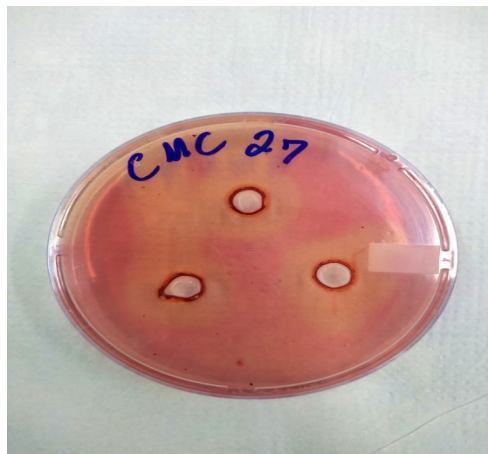


Figura 5. Atividade celulolítica de CFAM 0027 *A. oryzae*.

A zona mais clara ao redor das colônias corresponde ao halo indicador da degradação por atividade celulolítica. A visualização do halo depende de diversos fatores, incluindo a adição de algumas substâncias químicas do meio de cultura, que podem interferir no corante e gerar resultados falso-positivos, provocar sua precipitação ou inibir a ligação deste aos polissacarídeos (Neirotti e Azevedo, 1988). CRAGG et al. (2015) afirmam que a cristalinidade da celulose configura um obstáculo para a ação das enzimas, dificultando o acesso das mesmas. IRFAN et al. (2012) relatam que a natureza insolúvel e a estrutura cristalina da celulose dificultam a sua degradação. O halo formado pelo fungo CFAM 0027 *A. oryzae* exposto neste estudo, é maior do que o halo formado pelo fungo *Aspergillus foetidus* MTCC 10367 (1,8 cm), investigado por Pasha et al. (2013). Griebeler et al., (2015) investigaram uma seleção de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* com potencial para a produção de amilases, proteases, celulases e pectinases e obtiveram resultados da atividade celulolítica para *A. sp.* entre 1,4 cm e 1,7 cm, inferiores ao presente estudo. Segundo Singhania et al. (2010), os fungos filamentosos são as maiores fontes de celulases e hemicelulases. Para Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004), a maior parte das celulases comerciais são produzidas por fungos filamentosos do gênero *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus*. As enzimas celulolíticas obtidas a partir de fungos tem sido cada vez mais investigadas devido a sua aplicabilidade em diversas áreas comerciais, como na indústria têxtil e de detergentes (Souza et al., 2008) e na indústria alimentícia, algumas espécies do gênero *Aspergillus* são empregadas no processo de liquefação de frutas para a produção de sucos (Food Ingredients Brasil, 2011).

Embora a maioria dos resultados de degradação enzimática estejam abaixo do descrito por Stamford et al. (1998), alguns padrões para otimização da produção de enzimas ainda precisam ser observados, uma vez que variações de pH, temperatura e

concentrações do substrato podem interferir na capacidade catalítica das enzimas. Lehninger et al.(2002) propuseram que as enzimas possuem um pH ótimo no qual a atividade catalítica é maximizada, ou seja, a variação no pH (mais ácido ou mais alcalino), pode levar a desnaturação e conseqüente perda da atividade biológica. A temperatura é outro fator determinante da atividade enzimática: quanto maior for a temperatura, maior será a velocidade da reação. No entanto, existe uma temperatura limite para que não ocorra a desnaturação da enzima. Essa temperatura na qual ocorre a atividade máxima é denominada temperatura ótima (Lehninger et al., 2002). Para Amin et al. (2011), a concentração do substrato é proporcional à atividade enzimática, ou seja, o aumento da concentração leva à uma maior produção da enzima.

## 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que os fungos depositados na Coleção de Fungos da Amazônia foram capazes de produzir amilases, celulasas, proteases e lipases, sendo estas, biomoléculas de grande importância comercial. Estes resultados podem ser considerados promissores, uma vez que evidenciam a potencialidade da aplicação biotecnológica de fungos da Amazônia em diferentes setores da indústria.

## REFERÊNCIAS

AGRAWAL, D. et al. **Production of alkaline protease by *Penicillium* sp. under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis.** Process biochemistry, v. 39, n. 8, p. 977-981, 2004.

AMIN, F.; BHATTI, H. N.; REHMAN, S. **Optimization of growth parameters for lipase production by *Ganoderma lucidum* using response surface methodology.** African Journal of Biotechnology, v. 10, n. 28, p. 5514-5523, 2011.

BRAGA, A. A.; DE MORAIS, P. B.; LINARDI, V. R. **Screening of yeasts from Brazilian Amazon rain forest for extracellular proteinases production.** Systematic and applied microbiology, v. 21, n. 3, p. 353-359, 1998.

CARVALHO, P. D. O. et al. **Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas.** Química Nova, 2005.

CASTRO, A. M. D.; PEREIRA JR, N. **Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais.** Química Nova, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CHRZANOWSKA, J.; KOLACZKOWSKA, M.; POLANOWSKI, A. **Produção de enzimas proteolíticas exocelulares por várias espécies de *Penicillium*.** Enzima e tecnologia microbiana, v. 15, n. 2, p. 140-143, 1993.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia enzimática.** Editora EPUB, 2008.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. **Application of solid-state fermentation to food industry—a review.** Journal of Food Engineering, v. 76, n. 3, p. 291-302, 2006.

CRAGG, S. M. et al. **Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life.** Current Opinion in Chemical Biology, v. 29, p. 108-119, 2015.

DE SOUZA, H. Q.; DE OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S. **Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 28, n. 1, p. 116-124, 2008.

DURAND-POUSSEREAU, N.; FEVRE, M. **Characterization of a protease deficient strain of Penicillium roqueforti generated by heterologous plasmid integration: potential use for protein production.** Journal of biotechnology, v. 51, n. 1, p. 97105, 1996.

ELLAIAH, P.; SRINIVASULU, B.; ADINARAYANA, K. **A review on microbial alkaline proteases.** 2002. Disponível em: <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/26375>. Acesso em 13 ago. 2019 às 22:32.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Novo microrganismo produz enzima de interesse industrial com mais sustentabilidade.** Brasília (DF), 2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/28467220/novo-microrganismo-produz-enzima-de-interesse-industrial-com-mais-sustentabilidade>. Acesso em: 15 jul. 2019 às 17:40.

FERNANDES, A. P. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes.** Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2009.

FERNANDES, K. F.; LIMA, C. S.; LOPES, F. M. **Técnicas de imobilização de enzimas.** Revista Processos Químicos, v. 4, n. 7, p. 53-58, 2010.

FERNANDES, L. P. **Produção de amilases pelo fungo Macrophomina phaseolina.** Revista eletrônica de Farmácia, v. 4, n. 1, 2007.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Enzimas: natureza e ação nos alimentos.** Revista-Fi, 2011. Disponível em <http://www.revista-fi.com/materias/166.pdf>. Acesso em 03 jun. 2019 às 15:32.

GERMANO, S. et al. **Characterization and stability of proteases from Penicillium sp. Produced by solid-state fermentation.** Enzyme and microbial technology, v. 32, n. 2, p. 246-251, 2003.

GRIEBELER, N. E. et al. **Seleção de fungos filamentosos produtores de amilases, proteases, celulases e pectinases.** Revista Acadêmica Ciência Animal, v. 13, 2015.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. **Industrial applications of microbial lipases.** Enzyme and Microbial technology, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

HERNÁNDEZ, M. S. et al. **Amylase production by Aspergillus niger in submerged cultivation on two wastes from food industries.** Journal of food processing engineering, v. 73, p. 93-100, 2006.



IRFAN, Muhammad et al. Isolation and screening of cellulolytic bacteria from soil and optimization of cellulose production and activity. **Turkish Journal of Biochemistry/Turk Biyokimya Dergisi**, v. 37, n. 3, 2012. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/230674526\\_Isolation\\_and\\_screening\\_of\\_cellulolytic\\_bacteria\\_from\\_soil\\_and\\_optimization\\_of\\_cellulase\\_production\\_and\\_activity](https://www.researchgate.net/publication/230674526_Isolation_and_screening_of_cellulolytic_bacteria_from_soil_and_optimization_of_cellulase_production_and_activity). Acesso em 23 set. 2019 às 20:40.

JIN, B. et al. **Utilization of starch processing wastewater for production of microbial biomass protein and fungal  $\alpha$ -amylase by *Aspergillus oryzae***. Bioresource technology, v. 66, n. 3, p. 201-206, 1998.

KAMMOUN, R.; NAILI, B.; BEJAR, S. **Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product)**. Bioresource technology, v. 99, n. 13, p. 5602-5609, 2008.

KOKA, R.; WEIMER, B. C. **Isolation and characterization of a protease from *Pseudomonas fluorescens* RO98**. Journal of applied microbiology, v. 89, n. 2, p. 280-288, 2000.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**, 3 ed. 975p. São Paulo: Editora Sarvier, 2002.

LEOPOLDO, P. D. T. G. **Bioquímica**. 1 ed. São Cristóvão: Universidade Federal de Sergipe, CESAD, 2009.

LIMA, M.S. et al. **Potencial de fungos filamentosos na produção de enzimas utilizando diferentes fontes de amido**. Revista Brasileira de Agrotecnologia, v. 5, n. 1, p. 49-53, 2015.

MENDES, A. A. et al. **Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos**. Química Nova, v. 28, n. 2, p. 296-305, 2005.

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

NEIROTTI, E.; AZEVEDO, J. L. **Técnica semiquantitativa de avaliação da produção de celulasas em *Humicola* sp.** Revista de Microbiologia, v. 19, n. 1, p. 78-81, 1988.

NELSON, D. L.; COX, M. M.; **LEHNINGER, Princípios de Bioquímica**. Sarvier, 3ª edição. São Paulo, 2002.

OLIVEIRA, A. C. D. et al. **Utilização de resíduos da agroindústria para a produção de enzimas lipolíticas por fermentação submersa**. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, v. 15, n. 1, p. 19-26, 2013.

ORLANDELLI, R. C. et al. **Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações**. SaBios-Revista de Saúde e Biologia, v. 7, n. 3, 2012.

OYELEKE, S. B. et al. **Screening of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* strains for extracellular protease enzyme production**. Journal of Microbiology and Antimicrobials, v. 2, n. 7, p. 83-87, 2010.

PASHA, K. M. et al. **Screening of a pectinolytic fungal strain; *Aspergillus foetidus* MTCC 10367 for the production of multiple enzymes of industrial importance.** International Journal of Pharma and BioSciences, v. 4, n. 2, p. B1205-1209, 2013.

PEREIRA, A. R. B.; DE FREITAS, D. A. F. **Uso de microrganismos para a biorremediação de ambientes impactados.** Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental, v. 6, n. 6, p. 995-1006, 2012.

POLIZELLI, M. L.; RIZZATI, A. C.; MONTI, R., TERENCEI, H., JORGE, J. AMORIM, D. **Xylans and xylanases from fungi: properties and industrial applications.** Appl. Microbial. Biotechnol, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

RAO, Mala B. et al. **Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases.** Microbiol. Mol. Biol. Rev., v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RAPP, P.; BACKHAUS, S. **Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts, and bacteria.** Enzyme and Microbial Technology, v. 14, n. 11, p. 938-943, 1992.

RODARTE, M. P. **Atividade proteolítica de bactérias Leveduras e fungos isolados dos frutos e grãos de café (*Coffea arábica* L.).** 86p. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2005.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. **Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 30, n. 1, p. 126-131, 2010.

RUEGGER, M. J.; TAUK-TORNISIELO, S. M. **Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil.** Brazilian Journal of Botany, p. 205-211, 2004.

SALEEM, A.; EBRAHIM, M. KH. **Production of amylase by fungi isolated from legume seeds collected in Almadinah Almunawwarah, Saudi Arabia.** Journal of Taibah University for Science, v. 8, n. 2, p. 90-97, 2014.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. **Production, purification, characterization and applications of lipases.** Biotechnology advances, v. 19, n. 8, p. 627-662, 2001.

SILVA, C. F. **Isolamento e seleção de microrganismos produtores de enzimas de interesse comercial.** Scientia Plena, v. 14, n. 2, 2018. Disponível em: <https://scientiaplena.emnuvens.com.br/sp/article/view/3654>. Acesso em: 15 set. 2019 às 13:31.

SINGHANIA, R. R. et al. **Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases.** Enzyme and Microbial Technology, v. 46, n. 7, p. 541-549, 2010.

SINGHANIA, R. R. et al. **Recent advances in solid-state fermentation.** Biochemical Engineering Journal, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.

SOUZA, P. M. D. **Produção de protease por fungos filamentosos isolados do cerrado do centro-oeste brasileiro**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Fermentação). Universidade de São Paulo, São Paulo. 2015.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. **Atividade enzimática de microrganismos isolados do Jacatupé (Pachyrhizuserosus L. Urban)**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 18, n. 4, p. 382-385, 1998.

TEIXEIRA, M. F. S., et al. **Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada: (aplicações biotecnológicas)**. EDUA, Editora da Universidade Federal do Amazonas, 2011.

TRIPATHY, S. S.; DASH, S.; GUPTA, N. **Screening and selection of some fungi for production of extracellular amylase**. Indian J. Fundam Appl. Life Sci., v. 1, p. 131-136, 2011.

ZAMBARE, V.; NILEGAONKAR, S.; KANEKAR, P. **A novel extracellular protease from Pseudomonas aeruginosa MCM B-327: enzyme production and its partial characterization**. New biotechnology, v. 28, n. 2, p. 173-181, 2011.

## OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE QUITINASE PELO FUNGO ENDOFÍTICO *CURVULARIA* SP. URM 6861

Data de aceite: 01/10/2020

Data de submissão: 05/08/2020

### **Aline Gleyce Julião Bomfim**

Universidade Federal de Pernambuco - UFPE  
Recife - Pernambuco

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8553-6370>

### **Edson Flávio Teixeira da Silva**

Universidade Federal Rural de Pernambuco –  
UFRPE

Garanhuns - Pernambuco

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4122-8514>

### **Wellington Leal dos Santos**

Universidade Federal Rural de Pernambuco –  
UFRPE

Recife - Pernambuco

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6257-7743>

### **Maria Emília Brito da Silva**

Universidade Federal Rural de Pernambuco –  
UFRPE

Recife - Pernambuco

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9963-5422>

### **Cristina Maria de Souza-Motta**

Universidade Federal de Pernambuco - UFPE  
Recife – Pernambuco

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0964-8271>

### **Keila Aparecida Moreira**

Universidade Federal do Agreste de  
Pernambuco – UFAPE, Professora Associada  
IV, Laboratório de Microbiologia, Tecnologia  
Enzimática e Bioprodutos.

Garanhuns - Pernambuco

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7715-9285>

**RESUMO:** Na última década, a crescente busca por produtos de origem biológica tem sido intensa e, na atualidade, quitinases produzidas por microrganismos tem ganhado atenção devido ao potencial de biocontrole que esse grupo de enzimas apresenta. Fitopatologias causadas por fungos são uma problemática em todo o mundo, uma vez que são responsáveis por perdas expressivas na produção agrícola. O principal meio de combate e prevenção dessas doenças, é através dos agroquímicos e, devido aos efeitos negativos dos agrotóxicos causados ao meio ambiente e à saúde humana, a busca por metabólitos de origem biológica tem se intensificado. Fungos são uma fonte biológica promissora para a produção de metabólitos bioativos, dentre eles a enzima quitinase. Na produção de quitinases por fungos filamentosos, são utilizados indutores quitinolíticos comerciais como a quitina em pó, elevando os custos de produção. Diante disto, o estudo objetivou a otimização da produção de quitinase pelo fungo endofítico *Curvularia* sp. URM 6861 utilizando o farelo de soja como indutor alternativo à quitina em pó comercial. O fungo *Curvularia* sp. URM 6861 foi submetido a um *screening* inicial onde foi utilizado a quitina em pó comercial como indutor e obteve uma produção de 9,4 U mL<sup>-1</sup> sob fermentação submersa durante 72h. Para a otimização da produção de quitinase por *Curvularia* sp. URM 6861, os efeitos de seis variáveis (sacarose, farelo de soja, quitina coloidal, MgSO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) foram analisados pelo Design de Plackett-Burman (DPB). Sacarose e farelo de soja foram as variáveis que apresentaram significância e

influência positiva expressiva na produção de quitinase, com níveis entre 0,62 - 12,78 U mL<sup>-1</sup>. Com o DPB foi possível aumentar a produção enzimática em 36%, onde o farelo de soja se mostrou uma fonte indutora alternativa e de baixo custo para a produção da enzima quitinase sob fermentação submersa.

**PALAVRAS - CHAVE:** Fungo endofítico, Quitinase, Design de Plackett-Burman, Fermentação submersa, Farelo de soja

## OPTIMIZATION OF CHITINASE PRODUCTION BY THE ENDOPHYTIC FUNGI *CURVULARIA* SP. URM 6861

**ABSTRACT:** In the last decade, the growing search for products of biological origin was intense. Currently, chitinases producing by microorganisms gained attention due to the potential for biocontrol that this group of enzymes presents. Plant diseases caused by fungi are a problem worldwide since they are responsible for significant losses in agricultural production. The main control of these diseases is through by use of agrochemicals, and due to the negative effects of pesticides caused to the environment and human health, the search for metabolites of biological origin has intensified. Fungi are a promising biological source for the production of bioactive metabolites, among them the enzyme chitinase. In the production of chitinases by filamentous fungi, commercial chitinolytic inducers such as powdered chitin are used, increasing production costs. Before this, the study aimed to optimize chitinase production by the endophytic fungi *Curvularia* sp. URM 6861 using soybean meal as an alternative inducer to commercial powdered chitin. *Curvularia* sp. URM 6861 was subjected to an initial screening where commercial chitin powder was used as an inducer and obtained a production of 9.4 U mL<sup>-1</sup> under submerged fermentation for 72 hours. For the optimization of chitinase production by *Curvularia* sp. URM 6861, the effects of six variables (sucrose, soybean meal, colloidal chitin, MgSO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, and H<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) were analyzed by the Plackett-Burman Design (PBD). Sucrose and soybean meal were the variables that showed positive and significant influence on chitinase production, with levels between 0.62 - 12.78 U mL<sup>-1</sup>. The PBD increased enzyme production by 36%, where soybean meal proved to be an alternative and low-cost inducing source for the production of the chitinase enzyme under submerged fermentation.

**KEYWORDS:** Endophytic fungi, Chitinase, Plackett-Burman Design, Submerged fermentation, Soybean meal

## 1 | INTRODUÇÃO

Quitinases (E.C. 3.2.14) são enzimas que catalisam reações de hidrólise das ligações β-1,4-N-acetil-β-D-glicosamina da quitina (Brzezinska, 2014; Di Rosa et al., 2016). A maioria das quitinases ocorrem nas famílias 18, 19, 23 e 48 das glicosil-hidolases (GH), as fúngicas, pertencem à família GH18 e participam de processos fisiológicos como nutrição, parasitismo, morfogênese e defesa a estresses (Patil et al., 2013).

Fitopatologias causadas por fungos causam perdas expressivas na produção agrícola mundial (Jadhav et al., 2017) e o controle dessas doenças é feito, principalmente, por meio de defensivos agrícolas. De acordo com Bombardi (2017), o Brasil ocupa o

primeiro lugar no mundo no uso destes produtos, com um consumo de aproximadamente 16 kg de agrotóxicos por hectare.

Devido aos efeitos adversos e permanentes dos agroquímicos no ecossistema e na saúde humana, existe um interesse mundial em minimizar a aplicação de produtos químicos. O uso de metabólitos produzidos por microrganismos é uma alternativa de substituição *eco-friendly* na agricultura moderna para minimizar a possibilidade de patógenos resistentes e, como as quitinas são um constituinte principal e comum de fungos, insetos e nematoides (óvulos), elas também são suscetíveis a enzimas quitinolíticas (Halder et al., 2019).

Fungos endofíticos têm se mostrado uma alternativa de interesse econômico e ecológico bastante promissor pois, na atualidade, são uma potente fonte de produção e obtenção de novos metabólitos eficientes, dentre eles a enzima quitinase (Yu et al., 2010; Brakhage, 2013; Elgorban et al., 2018).

Para a obtenção de quitinase produzida por fungos, são usados meios fermentativos que utilizam um número elevado de componentes e fonte de quitina comercial como indutor, tornando o custo do processo elevado. O farelo de soja é um resíduo agroindustrial de baixo custo e rico em carboidratos (34,43%) (Sadh et al., 2018), podendo ser utilizado como fonte alternativa de carbono na obtenção de metabólitos por microrganismos.

Tendo como hipótese que o farelo de soja é um resíduo agroindustrial que pode induzir a produção de quitinase, o estudo objetivou a otimização da produção de quitinase pelo fungo endofítico *Curvularia* sp. URM 6861 sob fermentação submersa (FmS), empregando o Design de Plackett-Burman (DPB) como planejamento fatorial e utilizando o farelo de soja (FS) como indutor alternativo à quitina em pó comercial.

## 2 | METODOLOGIA

### 2.1 Obtenção do isolado de *Curvularia* sp. URM 6861

A cultura fúngica foi obtida da Micoteca URM, Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, isolada de *Cereus jamacaru* DC, em área de Caatinga, Município de Santa Terezinha, Paraíba, Brasil.

### 2.2 *Screening* da produção de quitinase por *Curvularia* sp. URM 6861 sob fermentação submersa em meio de quitina em pó

O fungo foi inoculado em frascos de Erlenmeyer (250 mL) contendo 25 mL do meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e incubado à temperatura de 28° C durante 5 dias. Em seguida, foi feita uma suspensão dos esporos em H<sub>2</sub>O destilada esterilizada adicionada de Tween 80 (0,02%). Um volume de 2 mL dessa suspensão foi utilizado como padronização de inóculo no processo fermentativo. O *screening* foi conduzido em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, onde foi utilizado 50 mL do meio contendo quitina em pó como indutor, composto de: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1 g L<sup>-1</sup>; KCl – 0,5 g L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O – 0,5 g L<sup>-1</sup>; FeSO<sub>4</sub> – 0,01 g L<sup>-1</sup>; CaCl<sub>2</sub> –

0,2 g L<sup>-1</sup>; ZnSO<sub>4</sub> – 0,002 g L<sup>-1</sup>; quitina em pó (Sigma-Aldrich) 42 g L<sup>-1</sup>; sacarose – 5 g L<sup>-1</sup> e pH 7,0, adicionado do inóculo fúngico previamente padronizado. A fermentação ocorreu a 30° C durante 72h em condições semiestáticas. O líquido metabólico foi filtrado com o auxílio de uma bomba a vácuo e centrifugado por 10min a 4°C. O sobrenadante foi considerado como o extrato enzimático bruto.

### 2.3 Atividade quitinolítica

A determinação da atividade da quitinase foi realizada em triplicata de acordo com a metodologia de Waghmare e Ghosh (2010) e a detecção dos açúcares redutores foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Miller (1959). Uma unidade de atividade quitinolítica foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de N-acetilglicosamina por minuto.

### 2.4 Otimização da produção enzimática utilizando o DPB

O efeito de seis variáveis para a produção de quitinase por *Curvularia* sp. URM 6861 foi analisado em três níveis (Tabela 1) em 16 ensaios (Tabela 2). Os resultados foram analisados no software *Statistica* 10.0.

Variáveis	Componentes	Níveis (g L <sup>-1</sup> )		
		-1	0	+1
Q <sub>1</sub>	Quitina coloidal	0	10	20
Q <sub>2</sub>	Farelo de soja	10,5	26,25	42
Q <sub>3</sub>	Sacarose	2	5	8
Q <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0	0,25	0,5
Q <sub>5</sub>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1	2	3
Q <sub>6</sub>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0	0,25	0,5

Tabela 1. Matriz do Design de Plackett-Burman das variáveis independentes utilizadas para a otimização da produção de quitinase por *Curvularia* sp. URM 6861.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de quitinase pelo fungo *Curvularia* sp. URM 6861 no *screening* inicial utilizando quitina em pó como fonte principal, apresentou atividade enzimática de 9,4 U mL<sup>-1</sup>. São elevados os números de estudos em relação à produção de quitinase por fungos onde utiliza-se a FmS (Karthik et al., 2014; Pilantanapak et al., 2017; Abu-Tahon e Isaac, 2020), devido às vantagens no controle do processo e fácil recuperação. A produção extracelular de quitinase é influenciada por vários fatores como fontes de carbono e nitrogênio e uma das fontes de carbono utilizadas como indutor na produção de quitinase por fungos é a quitina em pó comercial, uma vez que é rica em carbono e representa uma fonte energética

disponível para o crescimento do microrganismo.

No entanto, o alto custo da quitina em pó comercial nos direciona na busca para a substituição de indutores quitinolíticos de baixo custo. Para isto, se faz necessário a utilização de planejamentos fatoriais, pois quando o fator a ser estudado não é totalmente conhecido, o planejamento fatorial estabelece coeficientes essenciais em um tempo curto de experimentação e valores mais elevados de produção (Latha et al., 2017).

Com o Design de Plackett-Burmann na otimização, foi possível definir os fatores que possuem significância na produção de quitinase por *Curvularia* sp. URM 6861, onde foram obtidas variações nos níveis de produção de 0,62 - 12,78 U mL<sup>-1</sup> (Tabela 2). O melhor resultado da atividade de quitinase foi observado no ensaio 2 (12,78 U mL<sup>-1</sup>), composto de 1 mL de quitina coloidal; 2,10 g de farelo de soja; 0,4 g de sacarose e 0,05 g de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>.

Ensaio	Variáveis da Matriz Experimental (g/50mL)						Atividade de quitinase (U mL <sup>-1</sup> )	
	Q <sub>1</sub>	Q <sub>2</sub>	Q <sub>3</sub>	Q <sub>4</sub>	Q <sub>5</sub>	Q <sub>6</sub>	Observado <sup>1</sup>	Estimado <sup>2</sup>
<b>1k</b>	1	0,525	0,1	0	0,05	0,025	1,52	1,04
<b>2Aa</b>	1	2,10	0,4	0	0,05	0	12,78	12,43
<b>3i</b>	0	2,10	0,1	0,025	0,05	0	4,81	5,02
<b>4h</b>	1	0,525	0,4	0	0,15	0	8,01	8,81
<b>5c</b>	1	2,10	0,4	0,025	0,05	0,025	11,64	12,59
<b>6i</b>	1	2,10	0,1	0,025	0,15	0	4,81	4,80
<b>7b</b>	0	2,10	0,4	0	0,15	0,025	12,30	11,32
<b>8g</b>	0	0,525	0,4	0,025	0,05	0,025	8,45	8,19
<b>9g</b>	0	0,525	0,4	0,025	0,15	0,025	8,42	8,31
<b>19m</b>	1	0,525	0,1	0,025	0,15	0,025	0,62	1,19
<b>11j</b>	0	2,10	0,1	0	0,15	0,025	1,88	3,54
<b>12l</b>	0	0,525	0,1	0	0,05	0	0,84	1,25
<b>13h</b>	0,5	1,312	0,25	0,0125	0,1	0,0125	8,04	6,69
<b>14ed</b>	0,5	1,312	0,25	0,0125	0,1	0,0125	9,34	6,69
<b>15d</b>	0,5	1,312	0,25	0,0125	0,1	0,0125	9,53	6,69
<b>16f</b>	0,5	1,312	0,25	0,0125	0,1	0,0125	9,08	6,69

Tabela 2. Matriz das variáveis dos ensaios em diferentes concentrações do Design de Plackett-Burman e atividade de quitinase produzida por *Curvularia* sp. URM 6861.

<sup>1</sup>– Valores da resposta experimental / <sup>2</sup> – Valores da resposta estimados pelo modelo estatístico. Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados seguidos das letras minúsculas representam a análise dos ensaios; os resultados seguidos da mesma letra não diferem entre si; a letra maiúscula em negrito representa o melhor resultado e melhor composição do meio fermentativo para produção de quitinase.



Na análise de variância (ANOVA), o gráfico de Pareto (Figura 1), demonstrou que farelo de soja e sacarose foram as variáveis que apresentaram significância e influência positiva na produção de quitinase. Os valores positivos da quitina coloidal e  $MgSO_4$  indicam que o aumento destes componentes no meio fermentativo irá influenciar positivamente na produção. No entanto,  $NH_4NO_3$  e  $K_2HPO_4$  indicaram efeito negativo na produção. No gráfico de superfície de resposta (Figura 2) pode ser observada a interação da sacarose ( $Q_3$ ) com o farelo de soja ( $Q_2$ ) em relação à produção de quitinase, onde o aumento da concentração de farelo de soja e sacarose resultará em maior produção.

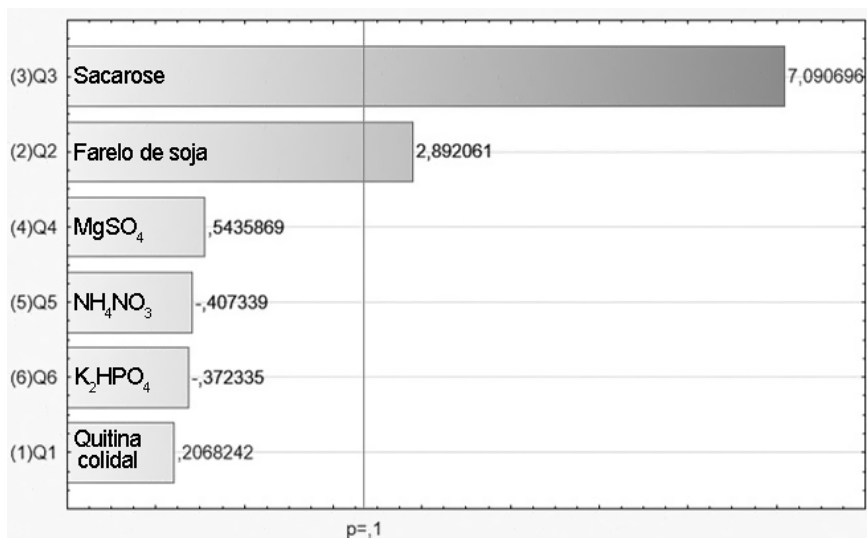


Figura 1. Gráfico de Pareto gerado a 90% de significância. Efeitos das seis variáveis utilizadas no Design de Plackett-Burman na produção de quitinase por *Curvularia sp.* URM 6861.

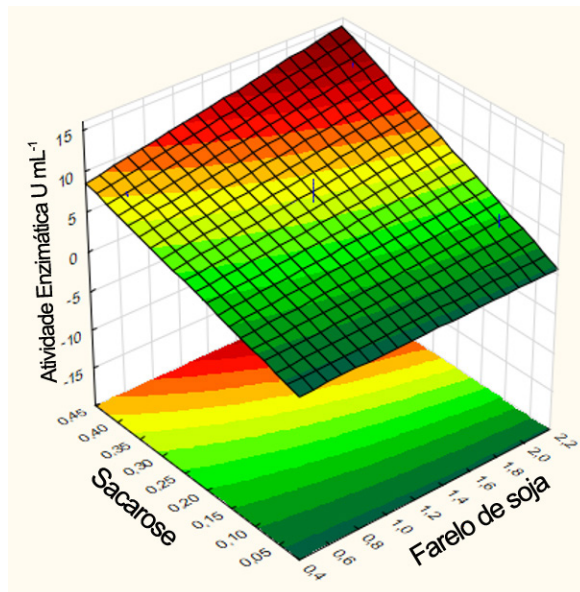


Figura 2. Gráfico de Superfície de Resposta do efeito e interação entre sacarose e farelo de soja na produção de quitinase por *Curvularia* sp. URM 6861.

Resultados obtidos por Aita et al. (2019), demonstraram que a utilização de grãos de soja como substrato alternativo foi eficiente para a otimização da produção de quitinase pelo fungo *Metarhizium anisopliae* (12,14 U g<sup>-1</sup>). De acordo com Ghanem et al. (2010), fontes de carbono se tornam mais viáveis para microrganismos, que os permite iniciar o crescimento no meio e assim hidrolisar e produzir o metabólito de interesse.

Diante disto, a utilização do farelo de soja, que é rico em carboidratos, é um potencial substituto dos indutores quitinolíticos comerciais, uma vez que é rico em carbono e promove energia para o crescimento microbiano. Com o DPB foi obtido um aumento de 36% na produção de quitinase pelo fungo *Curvularia* sp. URM 6861 em relação ao meio de cultura contendo quitina em pó comercial; 12,78 U mL<sup>-1</sup> e 9,4 U mL<sup>-1</sup>, respectivamente, demonstrando assim que, a utilização de substratos alternativos em conjunto com modelos estatísticos de otimização, diminui os custos e eleva a eficácia na obtenção de uma maior produção da quitinase.

## 4 | CONCLUSÕES

A utilização do Design de Plackett-Burman é eficaz na otimização da produção de quitinase pelo fungo *Curvularia* sp. URM 6861, a qual tem possibilidade em aumentar a produção enzimática em 36% em relação ao meio fermentativo contendo quitina comercial em pó. O farelo de soja é um substituto eficiente dos indutores quitinolíticos comerciais, sendo

uma fonte indutora alternativa e de baixo custo na produção de quitinase sob fermentação submersa podendo ser aplicada para fins industriais, dentre eles, a agroindústria.

## REFERÊNCIAS

ABU-TAHON, M. A.; ISAAC, G. S. **Anticancer and antifungal efficiencies of purified chitinase produced from *Trichoderma viride* under submerged fermentation.** The Journal of General and Applied Microbiology, v 66, p. 32-40, 2020.

AITA, B. C.; SPANNEBERG, S. S.; SCHMALTZ, S.; ZABOT, G. L. *et al.* **Production of cell-wall degrading enzymes by solid-state fermentation using agroindustrial residues as substrates.** Journal of Environmental Chemical Engineering, v. 7, 2019.

BOMBARDI, L. M. **Geografia do uso de agrotóxicos no Brasil e conexões com a União Europeia.** São Paulo, FFLCH-USP, 296pp, 2017. ISBN:978-85-7506-310-1

BRAKHAGE, A. A. **Regulation of fungal secondary metabolism.** Nature Reviews Microbiology, v. 11, p. 21–32, 2013.

BRZEZINSKA, M. S.; JANKIEWICZ, U.; BURKOWSKA, A.; WALCZAK, M. **Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection.** Current Microbiology, v 68, p. 71–81, 2014.

DI ROSA, M.; DISTEFANO, G.; ZORENA K.; MALAGUARNERA L. **Chitinases and immunity: ancestral molecules with new functions.** Immunobiology, v 221, p. 399-411.

ELGORBAN, A. M.; BAHKALI, A. H.; ABDEL-WAHAB, M. A. **Natural products of *Alternaria sp.*, an endophytic fungus isolated from *Salvadora persica* from Saudi Arabia.** Saudi Journal of Biological Sciences, 2018.

GHANEM, K.M.; AL-GARNI, S.M.; AL-MAKISHAH, N.H. **Statistical optimization of cultural conditions for chitinase production from fish scales waste by *Aspergillus terreus*.** African Journal of Biotechnology, v. 9, p. 5135, 2010.

HALDER S. K.; PAL S.; MONDAL K.C. **Biosynthesis of fungal chitinolytic enzymes and their potent biotechnological appliances.** In: YADAV, A. MISHRA, S.; SINGH, S.; GUPTA, A. (Ed) **Recent advancement in white biotechnology through fungi.** Fungal Biology, p. 281-298, 2019.

JADHAV H. P.; SHAIKH S. S.; SAYYED R. Z. **Role of hydrolytic enzymes of rhizoflora in biocontrol of fungal phytopathogens: An overview.** Microorganisms for Sustainability, v 2, p. 183-203, 2017.

KARTHIK, N.; AKANKSHA, K.; BINOD, P.; PANDEY A. **Production, purification and properties of fungal chitinases-A review.** Indian Journal of Experimental Biology, v 52, p. 1025-1035, 2014.

LATHA, S.; SIVARANJANI, G.; DHANASEKARAN, D. **Response surface methodology: A nonconventional statistical tool to maximize the throughput of *Streptomyces* species biomass and their bioactive metabolites.** Critical Reviews in Microbiology, v 43, p. 567-582, 2017

MILLER, G.L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** Analytical Chemistry, v. 31, p. 426-429, 1959.

PATIL, N. S.; WAGHMARE, S. R.; JADHAV, J. P. **Purification and characterization of an extracellular antifungal chitinase from *Penicillium ochrochloron* MTCC 517 and its application in protoplast formation.** Process Biochemistry, v 48, p. 176–183, 2016.

PILANTANAPAK, A.; YAOWAPHA, W.; PHATTHARAWADEE, E.; WATANALAI, P. **Production of chitooligosaccharides with antibacterial potential via crude chitinase enzymes from marine fungi.** Chiang Mai Journal of Science, v. 44, p. 1215-1221, 2017.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. **The design of optimum multifactorial experiments.** Biometrika, v 33, p. 305–325, 1946

SADH, P.K., DUHAN, S., DUHAN, J.S. **Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review.** Bioresource and Bioprocess, v. 5, 2018.

WAGHMARE, S.R. GHOSH, J.S. **Chitobiose production by using a novel thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* strain JS isolated from a mushroom bed.** Carbohydrate Research, v. 345, p. 2630–2635, 2010.

YU, H. S.; ZHANG, L.; LI, L.; ZHENG, C. J. *et al.* **Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes.** Microbiological Research, v. 165, p. 437-449, 2010.

# CAPÍTULO 12

## PARTIÇÃO DE PROTEASES FIBRINOLÍTICAS PRODUZIDAS POR *ASPERGILLUS TAMARII* KITA UCP 1279 ATRAVÉS DO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS PEG-FOSFATO

Data de aceite: 01/10/2020

Data de submissão: 20/08/2020

**Ana Lucia Figueiredo Porto**

Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Recife – Pernambuco  
<http://lattes.cnpq.br/4989617783837981>

**Viviane do Nascimento e Silva Alencar**

Universidade Federal de Pernambuco  
Recife – Pernambuco  
<http://lattes.cnpq.br/6780280958206384>

**Ana Cristina Lima Leite**

Universidade Federal de Pernambuco  
Recife – Pernambuco  
<http://lattes.cnpq.br/8115160528911145>

**Maria Clara do Nascimento**

Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Recife – Pernambuco  
<http://lattes.cnpq.br/5929405825655717>

**Julyanne Victória dos Santos Ferreira**

Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Recife – Pernambuco  
<http://lattes.cnpq.br/8901230412759036>

**Márcia Nieves Carneiro da Cunha**

Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Recife – Pernambuco  
<http://lattes.cnpq.br/5717867430918774>

**Juanize Matias da Silva Batista**

Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Recife – Pernambuco  
<http://lattes.cnpq.br/6699725036732885>

**Thiago Pajeú Nascimento**

Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Recife – Pernambuco  
<http://lattes.cnpq.br/6243710241063546>

**Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa**

Universidade de Pernambuco  
Recife – Pernambuco  
<http://lattes.cnpq.br/1797280118220965>

**RESUMO:** A fibrina é uma proteína estrutural responsável pela formação de coágulos sanguíneos. Entretanto uma desregulação nesse processo pode provocar acúmulo de coágulos na corrente sanguínea, desencadeando doenças graves como embolia pulmonar, trombose e acidente vascular cerebral. Proteases com atividade fibrinolítica atuam na dissolução desses coágulos sanguíneos a partir da “quebra”, por hidrólise, da molécula de fibrina. Devido a esse potencial das enzimas fibrinolíticas, essas se tornaram alvos de diversas pesquisas de aplicação. As enzimas de origem microbianas se tornam muito interessantes, já que proporcionam fácil manuseio, produtividade alta e baixo custo de produção. No bioprocessamento para a produção dessas enzimas os sistemas de duas fases aquosas (SDFA) constituem-se em uma técnica que pode, com uma única etapa, clarificar, extrair, pré-purificar e concentrar a amostra. O SDFA frequentemente é composto por polímeros e sais, que quando suas concentrações estão acima da curva de equilíbrio resulta na formação de duas fases imiscíveis, as quais podem ser utilizadas para separar os contaminantes do composto de

interesse. O objetivo desse trabalho foi particionar proteases fibrinolíticas produzidas por *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279 através do sistema de duas fases aquosas PEG-Fosfato. O extrato bruto obtido com o processo de fermentação em estado sólido apresentou atividade fibrinolítica de 25,49 U/mL, esse extrato bruto foi adicionado ao um SDFA composto por PEG e Fosfato em diferentes concentrações, de acordo com um planejamento fatorial 2<sup>4</sup>. As melhores condições de pré-purificação da enzima foram as obtidas com 12,5% de PEG 8000, 15% de Fosfato e pH 8.0, onde obteve-se um coeficiente de partição (K) de 0,06, rendimento (Y) na fase sal de 487,2% e fator de purificação (FP) de 14,1. A pré-purificação da enzima fibrinolítica do *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279 por SDFA PEG-Fosfato apresentou um bom fator de purificação, demonstrando a eficiência do método de purificação escolhido.

**PALAVRAS - CHAVE:** Enzima fibrinolítica; Sistema bifásico; *Aspergillus tamarii*; Fermentação; Extração.

## PARTITIONING FIBRINOLYTIC PROTEASES PRODUCED BY *ASPERGILLUS TAMARII* KITA UCP 1279 USING PEG-PHOSPHATE AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS

**ABSTRACT:** Fibrin is a structural protein responsible for the formation of blood clots. However, a deregulation in this process can cause clots to accumulate in the bloodstream, triggering serious diseases such as pulmonary embolism, thrombosis and stroke. Proteases with fibrinolytic activity act in the dissolution of these blood clots by “breaking”, by hydrolysis, the fibrin molecule. Due to this potential of fibrinolytic enzymes, they become targets for several application researches. The enzymes of microbial origin become very interesting, since they provide easy handling, high productivity and low production cost. In the bioprocess for the production of these enzymes, the aqueous two-phase systems (ATPS) are previously used in a technique that can, with a single step, clarify, extract, pre-purify and concentrate a sample. ATPS is often composed of polymers and salts, which when their concentrations are above the equilibrium curve results in the formation of two immiscible phases, as ATPS can be used to separate contaminants from the compound of interest. The objective of this study was to partition fibrinolytic proteases produced by *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279 through the two-phase aqueous PEG-Phosphate system. The crude extract obtained by the solid state fermentation process presented fibrinolytic activity of 25.49 U/mL, this crude extract was added to an ATPS composed of PEG and Phosphate in different specifications, according to a factorial design 2<sup>4</sup>. The best enzyme pre-purification conditions were obtained with 12.5% PEG 8000, 15% phosphate and pH 8.0, where a partition coefficient (K) was 0.06, the yield (Y) in the salt phase was 487.2% and the purification factor (PF) was 14.1. The pre-purification of the fibrinolytic enzyme of *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279 by ATPS PEG-Phosphate presented a good purification factor, demonstrating an efficiency of the chosen purification method.

**KEYWORDS:** Fibrinolytic enzyme; Two-phase system; *Aspergillus tamarii*; Fermentation; Extraction.

## 1 | INTRODUÇÃO

A fibrina é uma proteína estrutural formada a partir de reações de polimerização

na corrente sanguínea (CHOI *et al.*, 2018). Esta molécula é responsável pela formação dos coágulos sanguíneos, onde age como uma malha que envolve os componentes do sangue. A coagulação excessiva pode ser desencadeada por diversas razões, como por exemplo, distúrbios hereditários (AIELLO *et al.*, 2020), acidentes com animais peçonhentos (SARTIM *et al.*, 2017) e pela ação do hormônio estrogênio (ABOUL *et al.*, 2020). O acúmulo de coágulos sanguíneos pode desenvolver doenças graves e bastante incidentes como a embolia pulmonar, trombose e o acidente vascular cerebral (AVC). Devido a isso, é comum a busca por compostos que proporcionem a clivagem das ligações peptídicas das moléculas de fibrina e, conseqüentemente, a dissolução dos coágulos, o que pode se dar por enzimas proteolíticas, as denominadas proteases fibrinolíticas (ARAÚJO *et al.*, 2018; KRAUSE *et al.*, 2019).

Esse potencial das proteases fibrinolíticas, as torna alvos de diversas pesquisas de aplicação, traduzindo-se em uma ampla gama de subprodutos. Os fármacos já existentes para o tratamento das enfermidades supracitadas possuem intensos efeitos colaterais, o que aumenta ainda mais a procura por proteases fibrinolíticas, já que estas atuam diretamente no coágulo sanguíneo, superando algumas das desvantagens dos fármacos já disponíveis no mercado. Outra razão para o aumento dessa procura, se dá pelo mercado global industrial de enzimas, que caracteriza uma visão positiva no setor financeiro, já que o mercado está projetado para atingir US \$ 10,519 milhões em 2024, registrando uma taxa de crescimento anual composta de 5,7% de 2018 a 2024 (NASCIMENTO *et al.*, 2016; PORTLAND, 2018).

As proteases fibrinolíticas podem ser obtidas através de plantas como as sementes de *Gliricidia sepium* e o látex da figueira *Ficus carica* (DA SILVA *et al.*, 2019; HAMED *et al.*, 2020), de animais tais como o anelídeo *Whitmania pigra* e a serpente *Bothrops jararaca* (JIANG *et al.*, 2020; OLAOBA *et al.*, 2020), como também de microrganismos: bactérias (*Bacillus* sp., *Streptomyces* sp.), fungos (*Mucor* sp., *Aspergillus* sp.) e microalgas (*Chlorella* sp.) (CHANDRAMOHAN *et al.*, 2019; E SILVA *et al.*, 2018; NASCIMENTO *et al.*, 2016; OCHNEVA *et al.*, 2019; SUN *et al.*, 2016). Devido às questões éticas que envolvem a manipulação de animais e aos distúrbios climáticos que podem atingir as plantações, juntamente com o alto custo gerado com a produção de proteases fibrinolíticas obtidas dessas fontes, a utilização de microrganismos têm se tornado muito interessante, já que proporciona fácil manuseio, produtividade alta e baixo custo de produção (DA SILVA *et al.* 2019; DORNBUSCH *et al.* 2000; GURUMALLESH *et al.*, 2019; WANG *et al.* 2012).

Quando a produção de enzimas se dar por microrganismos, faz-se necessário a aplicação de algum tipo de bioprocessamento, que são etapas que compreendem desde o tratamento do meio no qual o microrganismo irá se multiplicar até a formulação final do bioproduto (FLORES *et al.*, 2019). De acordo com as técnicas empregadas no bioprocessamento, a demanda por tempo e verba podem se tornar altas, por isso é contínuo a busca por procedimentos que diminuam tais problemáticas. Como alternativa de diminuição das

etapas do *downstream* destaca-se o sistema de duas fases aquosas (SDFA), uma técnica que pode, com uma única etapa, clarificar, extrair, pré-purificar e concentrar a amostra. O SDFA frequentemente é composto por polímeros e sais, que em concentrações acima da curva de equilíbrio, resulta na formação de duas fases imiscíveis, onde podem ser utilizadas para separar os contaminantes do composto de interesse, realizando a sua purificação (IQBAL *et al.*, 2016).

O objetivo desse trabalho foi particionar proteases fibrinolíticas produzidas por *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279 através do sistema de duas fases aquosas PEG-Fosfato.

## 2 | METODOLOGIA

### Microrganismo

Foi utilizado nesta pesquisa, o fungo *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279 (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado/ Cadastro N° AA30B0B) isolado do solo da Caatinga do estado de Pernambuco, através do projeto RENNORFUN/CNPq/FACEPE e encontra-se na coleção de culturas da Universidade Católica de Pernambuco.

### Fermentação em estado sólido

A linhagem foi mantida em meio sólido CZ (Czapek Dox Ágar) e incubado a 30°C por 7 dias até esporulação. Como substrato foram utilizadas 3g de substrato agroindustrial, farelo de trigo, em erlenmeyers de 125mL seguido de esterilização a 121°C/1atm por 30min. O substrato foi então umedecido com uma solução de sacarose (200g/L) para alcançar o teor de umidade 70% e inoculado com uma concentração de 10<sup>7</sup> esporos/mL. Os erlenmeyers foram colocados em estufa incubadora BOD durante 48 horas a 30°C (BATISTA *et al.*, 2020).

### Extração do caldo fermentado

A extração foi realizada utilizando a proporção de 7,5 mL de água destilada para cada 1g de substrato, o qual foi encaminhado para um agitador orbital a 100 rpm por 2 horas. Em seguida, foi realizada a filtração, utilizando papel de filtro (Watman n°1), por fim, realizou-se uma centrifugação por 20 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi encaminhado para realização das demais etapas (BATISTA *et al.*, 2020).

### Dosagem de proteína total

O método descrito por SMITH *et al.* (1985) foi utilizado para a determinação da concentração de proteínas totais. Albumina de soro bovino foi utilizada como substância padrão para a curva de calibração.



## Atividade Fibrinolítica

Para a determinação da atividade fibrinolítica foi utilizado o método descrito por WANG *et al.* (2011), na qual foi preparada uma solução contendo fibrinogênio, tampão Tris-HCl- NaCl (pH 7,75), tampão fosfato (pH 7,0) e 20 U/mL de trombina. Com essa metodologia, uma unidade de degradação de fibrina (U) da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de causar um aumento de 0,01 por minuto na absorbância a 275 nm.

## Partição das enzimas através do Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA)

O sistema de duas fases aquosas foi preparado em tubos graduados de 15mL, neles foram adicionadas soluções do polímero polietilenoglicol (PEG), sais de fosfato e água destilada conforme as condições estabelecidas pelo planejamento estatístico 2<sup>4</sup>, exposto na Tabela 1. Em seguida, foi acrescentado ao SDFA 1g do extrato bruto de fermentação. Após 60 minutos de repouso, as duas fases, rica em PEG (fase superior) e rica em sal (fase inferior), foram separadas em tubos diferentes para a determinação da atividade fibrinolítica.

Variáveis	Níveis		
	Menor (-1)	Central (0)	Maior (+1)
aMPEG (g/mol)	1500	4000	8000
bCPEG (% p/p)	12,5	15,0	17,5
cCPHO (% p/p)	10,0	12,5	15,0
pH	6,0	7,0	8,0

Tabela 1 - Matriz do planejamento fatorial 2<sup>4</sup> usado para a purificação parcial da protease fibrinolítica do *Aspergillus tamarii* Kita UCP 1279 por SDFA PEG/fosfato.

<sup>a</sup> Massa molar do PEG; <sup>b</sup> Concentração do PEG; <sup>c</sup> Concentração de fosfato.

## Definição das equações do SDFA

A razão da atividade fibrinolítica na fase superior (FAs) sobre a atividade fibrinolítica na fase inferior (FAi), estabeleceu o coeficiente de partição (K) (Equação 1).

$$K = \frac{AF_s}{AF_i}$$

Eq. 1

Como observado na Equação 2, o fator de purificação (FP) foi determinado pela divisão da atividade específica na fase inferior do sistema (AE) pela atividade específica no

extrato bruto ( $AE_e$ ). A atividade específica é a razão da atividade fibrinolítica em cada fase pela concentração de proteínas totais presentes na respectiva fase.

$$FP = \frac{AE_i}{AE_e} \quad \text{Eq. 2}$$

Para a determinação do rendimento da atividade fibrinolítica ( $Y$ ), foi calculada a razão da atividade fibrinolítica da fase inferior ( $AF_i$ ) multiplicada pelo volume da fase inferior ( $V_i$ ) e a atividade fibrinolítica do extrato bruto ( $AF_e$ ) multiplicado pelo volume de extrato bruto adicionado ao SDFA ( $V_e$ ), o resultado foi expresso em porcentagem (%) (Equação 3).

$$Y = \frac{AF_i \times V_i}{AF_e \times V_e} \times 100 \quad \text{Eq. 3}$$

O balanço de massa (BM) foi o resultado da razão entre a soma da multiplicações da atividade fibrinolítica na fase superior ( $AF_s$ ) pelo volume da fase superior ( $V_s$ ) e a atividade fibrinolítica na fase inferior ( $FA_i$ ) pelo volume da fase inferior ( $V_i$ ), e a multiplicação da atividade fibrinolítica do extrato bruto ( $AF_e$ ) pelo volume do extrato bruto ( $V_e$ ). O resultado desse cálculo foi multiplicado por 100, para ser expresso em valores percentuais (Equação 4).

$$BM = \frac{AF_s \times V_s + FA_i \times V_i}{AF_e \times V_e} \times 100 \quad \text{Eq. 4}$$

### **Análises estatísticas dos resultados**

Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 95%, utilizando o Software *Statistica* 8.0 (Statsoft Inc, 2008).

## **3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Processo fermentativo**

Os dados sobre o extrato bruto gerado no processo de fermentação em estado sólido do fungo *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279 são apresentados na Tabela 2.

	Atividade proteásica (U/mL)	Atividade fibrinolítica (U/mL)	Proteínas totais (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)
<b>Extrato bruto</b>	47,26	25,49	133,08	0,19

Tabela 2 – Dados do processo fermentativo.

O resultado de atividade fibrinolítica foi maior que o obtido por Sharma *et al.*, 2020 (1,90 U/mL) com o extrato bruto do *Bacillus cereus* RSA1 e o resultado de atividade específica foi maior que o obtido por Wang *et al.*, 2011 (0,05 U/mg) com o extrato bruto do *B. subtilis* TKU007.

### Partição das enzimas através do Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA)

O extrato bruto foi carregado ao sistema de duas fases aquosas nos ensaios propostos de acordo com o planejamento fatorial (Tabela 1), entretanto nos ensaios 5, 7 e 15 não houve formação de fases, isso se deve, provavelmente aos sais que compõem o meio de fermentação, que podem deslocar a curva binodal do sistema, alterando os requisitos para a formação de fases no sistema (da SILVA *et al.*, 2018).

A atividade fibrinolítica nos ensaios restantes variou de 1,9 U/mL a 3,7 U/mL na fase rica em PEG (dados não mostrados na tabela) e de 27,7 U/mL a 42,8 U/mL na fase rica em sal (Tabela 3), como pode ser observado, houve um aumento significativo (aumento de 67,9%) na atividade fibrinolítica da enzima quando extraída, comprovando que o SDFA foi eficiente na concentração da amostra.

Todos os ensaios exibiram coeficiente de partição ( $K$ ) menor que 1 (Tabela 3), demonstrando a partição da enzima preferencialmente para a fase rica em sal. Esse resultado foi semelhante ao obtidos por Sales *et al.*, 2013 com a protease fibrinolítica produzida pelo *Bacillus* sp. UFPEDA 485, também com Nascimento *et al.*, 2016 com as proteases fibrinolíticas produzidas por *Mucor subtilissimus* UCP1262 e Alhelli *et al.*, 2016 com as proteases do *Penicillium candidum* (PCA 1/TT031). Entretanto, o resultado foi diferente do encontrado por da Silva *et al.*, 2018 com o *Aspergillus tamarisii* URM4634, onde a protease particionou preferencialmente para a fase PEG.

A Figura 1 demonstra a influência das variáveis no coeficiente de partição ( $K$ ). De acordo com essa análise estatística, a variável que mais influenciou a partição da enzima para a fase rica em sal foi o pH, fenômeno justificado possivelmente pelo ponto isoelétrico da enzima, onde com o aumento de pH do sistema, a enzima apresentará uma maior quantidade de pontos ionizados, favorecendo sua migração para a fase sal e se afastando da fase PEG, que é a fase mais hidrofóbica do sistema. Essa característica química de cada molécula também justifica a distinção na partição de proteases fibrinolíticas oriundas de diferentes fontes, sejam microbianas ou não.

A interação entre as variáveis: massa molar do PEG, concentração do PEG e

concentração dos sais de fosfato foi a segunda mais significativa, devido a combinação de dois efeitos: volume de exclusão e *salting-in*. O efeito do volume de exclusão é caracterizado pelo aumento da massa molar do polímero e também sua concentração, o que ocasiona a exclusão, sem desnaturação, da biomolécula de interesse para a fase sal e o efeito *salting-in* que é o aumento da solubilidade de proteínas devido ao acréscimo nas concentrações do sal, onde os íons salinos interagem com as cargas iônicas das proteínas aumentando assim o número efetivo de cargas e a quantidade de moléculas de água fixadas à ionosfera proteica aumentando a solubilidade da enzima na fase sal.

As melhores condições de pré-purificação da enzima foram as obtidas com 12,5% de PEG 8000, 15% de Fosfato, pH 8.0 (ensaio 14), onde obteve-se um coeficiente de partição (K) de 0,06, rendimento (Y) na fase sal de 487,2%, fator de purificação (FP) de 14,1 e balanço de massas (BM) de 67,4%.

O rendimento foi bastante alto, 487,2%, valores de rendimento superiores a 100%, como no presente caso, podem estar associados à remoção de contaminantes e inibidores durante a partição, o que aumenta significativamente a atividade enzimática (NASCIMENTO *et al.*, 2016).

Com o método de pré-purificação foi possível obter um bom fator de purificação (14.1), outros pesquisadores também utilizaram o SDFA para pré-purificação, obtendo fatores de purificação menores que o encontrado nesse estudo, a exemplo de da Silva *et al.*, 2018 com as proteases do *Aspergillus tamarii* URM4634 (FP = 2,14); da Silva *et al.*, 2017 com as proteases do *Aspergillus tamarii* URM4634 (FP = 3,95), Alhelli *et al.*, 2016 com as proteases do *Penicillium candidum* (FP = 6,8) e Nascimento *et al.*, 2016 com as proteases fibrinolíticas produzidas por *Mucor subtilissimus* UCP1262 (FP = 10,0).

Ensaio	<sup>a</sup> M <sub>p</sub> (g/mol)	<sup>b</sup> C <sub>p</sub> (%)	<sup>c</sup> C <sub>s</sub> (%)	pH	<sup>d</sup> AF <sub>s</sub> (U/mL)	<sup>e</sup> K	<sup>f</sup> Y <sub>s</sub> (%)	<sup>g</sup> FP <sub>s</sub> (U/mL)	<sup>h</sup> BM
1	1500	12,5	10	6	35,2	0,07	276,2	6,7	65,3
2	8000	12,5	10	6	29,3	0,12	253,0	6,8	68,4
3	1500	17,5	10	6	31,5	0,07	222,4	7,5	90,7
4	8000	17,5	10	6	31,1	0,06	244,1	7,8	69,8
5	1500	12,5	10	8	-	-	-	-	-
6	8000	12,5	10	8	31,9	0,07	300,0	9,1	67,4
7	1500	17,5	10	8	-	-	-	-	-
8	8000	17,5	10	8	35,9	0,07	253,3	9,1	70,7
9	1500	12,5	15	6	27,7	0,10	238,6	8,7	69,5
10	8000	12,5	15	6	31,5	0,08	247,3	7,9	67,6
11	1500	17,5	15	6	36,7	0,09	316,9	9,3	75,3

12	8000	17,5	15	6	25,7	0,09	181,2	8,0	51,9
13	1500	12,5	15	8	37,7	0,10	295,9	12,8	66,8
<b>14</b>	<b>8000</b>	12,5	15	8	<b>41,4</b>	<b>0,06</b>	<b>487,2</b>	<b>14,1</b>	<b>67,4</b>
15	1500	17,5	15	8	-	-	-	-	-
16	8000	17,5	15	8	40,9	0,06	288,8	13,9	52,2
17 <sup>a</sup>	4000	15	12,5	7	42,0	0,07	296,7	10,8	61,1
18 <sup>b</sup>	4000	15	12,5	7	42,8	0,08	302,5	10,1	74,4
19 <sup>c</sup>	4000	15	12,5	7	41,3	0,08	324,2	13,1	59,3
20 <sup>d</sup>	4000	15	12,5	7	35,1	0,07	275,1	11,9	67,8

Tabela 3 - Partição das proteases fibrinolíticas obtidas por *Aspergillus tamaritii* Kita UCP1279 através do SDFA PEG-Fosfato.

<sup>a</sup> Massa molar do PEG; <sup>b</sup> Concentração do PEG; <sup>c</sup> Concentração do sal (fosfato); <sup>d</sup> Atividade fibrinolítica na fase rica em fosfato; <sup>e</sup> Coeficiente de partição; <sup>f</sup> Rendimento na fase rica em fosfato; <sup>g</sup> Fator de purificação na fase rica em fosfato; <sup>h</sup> balanço de massa; <sup>i</sup> Ponto central.

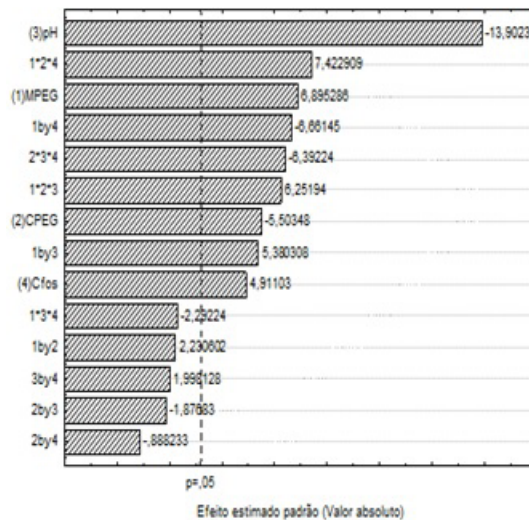


Figura 1 - Gráfico de Pareto demonstrando a influência das variáveis no coeficiente de partição (K) da extração das proteases fibrinolíticas produzidas por *Aspergillus tamaritii* Kita UCP1279.

## 4 | CONCLUSÕES

Na pré-purificação por SDFA PEG-Fosfato, a enzima fibrinolítica do *Aspergillus tamaritii* Kita UCP1279 demonstrou uma maior interação com a fase sal. O sistema proposto apresentou um bom fator de purificação na separação da biomolécula, se mostrando em um excelente meio para ser aplicado em etapas de purificação desta enzima.

## REFERÊNCIAS

ABOU, M. Y I.; SRIDHAR, D. C.; NAYAK, L. **Estrogen and thrombosis: A bench to bedside review.** *Thrombosis Research*, v. 192, p. 40-51, 2020.

AIELLO, G. *et al.* **Incidence of hereditary thrombophilia in patients with cranial dural arteriovenous fistulae.** *Journal of Clinical Neuroscience*, 2020.

ALHELLI, A. M. *et al.* **Response surface methodology modelling of an aqueous two-phase system for purification of protease from *Penicillium candidum* (PCA 1/TT031) under solid state fermentation and its biochemical characterization.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 11, p. 1–23, 2016.

ARAÚJO, J. P. *et al.* **Tendência da mortalidade por acidente vascular cerebral no município de Maringá, Paraná entre os anos de 2005 a 2015.** *International Journal of Cardiovascular Sciences*, v. 31, n. 1, p. 56-62, 2018.

BATISTA, J. M. S. *et al.* **Purification and biochemical characterization of an extracellular fructosyltransferase-rich extract produced by *Aspergillus tamaritii* Kita UCP1279.** *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, p. 101647, 2020.

CHANDRAMOHAN, M. *et al.* **Production, characterization and optimization of fibrinolytic protease from *Bacillus pseudomycoloides* strain MA02 isolated from poultry slaughter house soils.** *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 22, p. 101371, 2019.

CHOI J. H.; KIM K. J.; KIM S. **Purification and Antithrombotic Potential of a Fibrinolytic Enzyme from Shiitake Culinary- Medicinal Mushroom, *Lentinus edodes* GNA01 (Agaricomycetes).** *International Journal of Mushrooms*, v. 20 p. 47-59, 2018.

da SILVA, A. V. *et al.* **Partial purification of fibrinolytic and fibrinogenolytic protease from *Gliricidia sepium* seeds by aqueous two-phase system.** *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, p. 101669, 2020.

da SILVA, O. S. *et al.* **Partitioning and extraction protease from *Aspergillus tamaritii* URM4634 using PEG-citrate aqueous two-phase systems.** *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 9, n. December 2016, p. 168–173, 2017.

da SILVA, O. S.; ALVES, R. O.; PORTO, T. S. **PEG-sodium citrate aqueous two-phase systems to in situ recovery of protease from *Aspergillus tamaritii* URM4634 by extractive fermentation.** *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 16, p. 209–216, 2018.

da SILVA, M. M. *et al.* **Effect of acute exposure in swiss mice (*Mus musculus*) to a fibrinolytic protease produced by *Mucor subtilissimus* UCP 1262: An histomorphometric, genotoxic and cytological approach.** *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 103, p. 282-291, 2019.

DORNBUSCH, P.T. *et al.* **Tromboflebite jugular nos equinos.** *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária*, v. 3, n. 2, p. 47-53, 2000.

e SILVA, P. E. C. *et al.* **In vitro thrombolytic activity of a purified fibrinolytic enzyme from *Chlorella vulgaris*.** *Journal of Chromatography B*, v. 1092, p. 524-529, 2018.

FLORES, A.; WANG, X.; NIELSEN, D. R. **Recent trends in integrated bioprocesses: aiding and expanding microbial biofuel/biochemical production.** *Current opinion in biotechnology*, v. 57, p. 82-87, 2019.

GURUMALLESH, P. *et al.* **A systematic reconsideration on proteases.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 128, p. 254–267, 2019.

HAMED, M. B. *et al.* **A contradictory action of procoagulant ficin by a fibrinolytic serine protease from Egyptian *Ficus carica* latex.** *Biotechnology Reports*, p. e00492, 2020.

IQBAL, M. *et al.* **Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications.** *Biological procedures online*, v. 18, n. 1, p. 18, 2016.

JIANG, Q. *et al.* **Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Whitmania pigra* Whitman.** *Protein Expression and Purification*, p. 105680, 2020.

KRAUSE, A. I. *et al.* **Aspectos biofísicos da embolia pulmonar.** *Revista Interdisciplinar Pensamento Científico*, v. 5, n. 5, 2019.

LIU X. *et al.* **Biochemical characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Cordyceps militaris*.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 94b p. 793-801, 2017.

NASCIMENTO, T. P. *et al.* **Purification of a fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 by aqueous two-phase systems (PEG/sulfate).** *Journal of Chromatography B*, v. 1025, p. 16-24, 2016.

OCHNEVA, A. *et al.* **Usage of vermiculite as promising carrier for solid-state fermentation for fibrinolytic enzymes production by *Aspergillus* species.** *Journal of Biotechnology*, v. 305, p. S52, 2019.

OLAoba, O. T. *et al.* **Snake Venom Metalloproteinases (SVMPs): A structure-function update.** *Toxicon*: X, p. 100052, 2020.

PORTLAND, O. **Global Enzymes Market Expected to Reach \$10,519 Million by 2024.** 2018. Disponível em: <https://www.prnewswire.com/news-releases/global-enzymes-market-expected-to-reach-10-519-million-by-2024-898959866.html> Acesso em: 18 de ago. 2020.

SALES, A. E. *et al.* **Integrated process production and extraction of the fibrinolytic protease from *Bacillus* sp. UFPEDA 485.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 170, n. 7, p. 1676–1688, 2013.

SARTIM, M. A. *et al.* **Disseminated intravascular coagulation caused by moojenactivase, a procoagulant snake venom metalloprotease.** *International journal of biological macromolecules*, v. 103, p. 1077-1086, 2017.

SHARMA, C. *et al.* **Thrombolytic potential of novel thiol-dependent fibrinolytic protease from *Bacillus cereus* RSA1.** *Biomolecules*, v. 10, n. 1, p. 1–23, 2020.

SMITH, P. K. *et al.* **Measurement of protein using bicinchoninic acid.** *Analytical Biochemistry*, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.

SUN, Z. *et al.* **A fibrinolytic protease AfeE from *Streptomyces* sp. CC5, with potent thrombolytic activity in a mouse model.** International journal of biological macromolecules, v. 85, p. 346-354, 2016.

WANG, S.L.; WU Y. Y.; LIANG T.W. **Purification and biochemical characterization of a nattokinase by conversion of shrimp shell with *Bacillus subtilis* TKU007.** New Biotechnology, v. 28, n. 2, p. 196-202, 2011.

WANG, Y. *et al.* **Proteomics and transcriptome analysis coupled with pharmacological test reveals the diversity of anti-thrombosis proteins from the medicinal insect, *Eupolyphaga sinensis*.** Insect Biochemistry and Molecular Biology, v. 42, n. 8, p. 537-544, 2012.

YAO Z.; KIM J. A.; KIM J. H. **Gene cloning, Expression, and properties of a fibrinolytic enzyme secreted by *Bacillus pumillus* BS15 isolated from Gul (Oyster) Jeotgal.** Biotechnology and Bioprocess Engineering, v. 23 p. 293-301, 2018.



# CAPÍTULO 13

## PRODUÇÃO DE PROTEASES POR *ASPERGILLUS TAMARII* KITA UCP 1279 ISOLADO DA CAATINGA UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Data de aceite: 01/10/2020

Data de submissão: 20/08/2020

### **Julyanne Victória dos Santos Ferreira**

Universidade Federal Rural de Pernambuco.  
Recife - Pernambuco  
<http://lattes.cnpq.br/8901230412759036>

### **Kethylen Bárbara Barbosa Cardoso**

Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Departamento de Morfologia e Fisiologia  
Animal.  
Recife - Pernambuco  
<http://lattes.cnpq.br/4784303425329040>

### **Amanda Lucena dos Santos**

Universidade Federal Rural de Pernambuco.  
Recife - Pernambuco  
<http://lattes.cnpq.br/3697084385877618>

### **Viviane do Nascimento e Silva Alencar**

Universidade Federal de Pernambuco  
Recife – Pernambuco  
<http://lattes.cnpq.br/6780280958206384>

### **Maria Clara do Nascimento**

Universidade Federal Rural de Pernambuco.  
Recife - Pernambuco  
<http://lattes.cnpq.br/5929405825655717>

### **Marcia Nieves Carneiro da Cunha**

Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Departamento de Morfologia e Fisiologia  
Animal.  
Recife - Pernambuco  
<http://lattes.cnpq.br/5717867430918774>

### **Juanize Matias da Silva Batista**

Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Departamento de Morfologia e Fisiologia  
Animal.  
Recife - Pernambuco  
<http://lattes.cnpq.br/6699725036732885>

### **Romero Pedrosa Brandão Costa**

Universidade de Pernambuco, Instituto de  
Ciências Biológicas.  
Recife – Pernambuco  
<http://lattes.cnpq.br/1797280118220965>

### **Thiago Pajeú Nascimento**

Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Departamento de Morfologia e Fisiologia  
Animal.  
Recife - Pernambuco  
<http://lattes.cnpq.br/6243710241063546>

### **Ana Cristina Lima Leite**

Universidade Federal de Pernambuco  
Recife – Pernambuco  
<http://lattes.cnpq.br/8115160528911145>

### **Ana Lúcia Figueiredo Porto**

Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Departamento de Morfologia e Fisiologia  
Animal.  
Recife - Pernambuco  
<http://lattes.cnpq.br/4989617783837981>

**RESUMO:** Proteases são enzimas que realizam clivagem hidrolítica das ligações peptídicas das proteínas. Foram as primeiras enzimas a serem exploradas biotecnologicamente, possuem importância desde o processo de fabricação de detergentes ao potencial uso em produtos

farmacêuticos. São produzidas em grandes quantidades a partir de microrganismos, com grande destaque para os fungos filamentosos, pois possuem a capacidade de secretar enzimas extracelularmente facilitando etapas de purificação. Sendo assim, o presente trabalho objetivou produzir proteases a partir do *Aspergillus tamarii* Kita UCP 1279, isolado do bioma da Caatinga, utilizando a fermentação submersa e diferentes fontes de nitrogênio (farinha da casca de laranja, maracujá e de soja) e variando as suas concentrações (1,0%; 3,0% e 5,0%). Para este trabalho o fungo foi reativado da solução de óleo mineral em meio BDA (Batata – Dextrose – Ágar) sendo mantido por 7 dias a 30°C permitindo assim a esporulação. Para a fermentação o microrganismo foi inoculado em 120 rpm a 30°C por 48 horas. A máxima atividade proteásica (24,00 U/mL) foi obtida utilizando a farinha de soja na concentração de 3%. Portanto, de acordo com os resultados apresentados o *Aspergillus tamarii* Kita é um excelente produtor de proteases e o tipo de substrato pode influenciar diretamente na produção de proteases.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fungo Filamentoso, Fermentação Submersa, Hidrolase, Resíduos Agroindustriais.

## PROTEASE PRODUCTION BY *ASPERGILLUS TAMARII* KITA UCP 1279 ISOLATED FROM CAATINGA USING AGRO-INDUSTRIAL WASTE

**ABSTRACT:** Proteases are enzymes that perform hydrolytic cleavage of protein peptide bonds. They were the first enzymes to be explored biotechnologically, they have importance since the detergent manufacturing process to the potential use in pharmaceutical products. They are produced in large quantities from microorganisms, with great emphasis on filamentous fungi, as they have the ability to secrete extracellular enzymes, facilitating purification steps. Thus, the present work aimed to produce proteases from *Aspergillus tamarii* Kita UCP 1279, isolated from the Caatinga biome, using submerged fermentation and different sources of nitrogen (orange peel flour, passion fruit and soy) and varying their concentrations (1.0%; 3.0% and 5.0%). For this work, the fungus was reactivated from the mineral oil solution in BDA (Potato - Dextrose - Agar) being kept for 7 days at 30°C, thus allowing sporulation. For fermentation, the microorganism was inoculated at 120 rpm at 30°C for 48 hours. The maximum protein activity (24 U/mL) was obtained using soy flour at a concentration of 3%. Therefore, according to the results presented, the *Aspergillus tamarii* Kita is an excellent producer of proteases and the type of substrate can directly influence the production of proteases.

**KEYWORDS:** Filamentous fungi, Submerged Fermentation, Hydrolase, Agro-industrial waste.

## 1 | INTRODUÇÃO

Proteases são enzimas classificadas como hidrolases, pois são capazes de clivar as ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas. Diversas são as classes de enzimas proteolíticas que desempenham importantes papéis em diferentes segmentos industriais, como na indústria de detergentes e alimentos e em processos fisiológicos essenciais, como na coagulação sanguínea, morte celular e diferenciação de tecidos, o que as torna um alvo valioso para a aplicação em quimioterápicos na indústria farmacêutica. As proteases estão entre os três maiores grupos de enzimas industriais, sendo responsáveis

por 60% da venda internacional de enzimas (GURUMALLESH *et al.*, 2019).

As enzimas proteolíticas estão presentes nos seres vivos e representam cerca de 2% do total de proteínas presentes em todos os organismos, em vias metabólicas e de sinalização celular (VERMELHO, 2008). Como as proteases industriais, extraídas de plantas (papaína, bromelina, ficina) e de animais (peptidases digestivas) não atendem à demanda comercial, as proteases microbianas passam a ser uma alternativa para a produção de proteases e apresentam grande potencial para a aplicação industrial, já que podem ser facilmente produzidas em larga escala, via fermentação (GURUMALLESH *et al.*, 2019). A produção industrial de proteases por microrganismos é favorecida pela facilidade de manipulação genética, diversidade genética, pequeno tempo de geração e não estão sujeitas às limitações de produção ou de suprimento (RAO *et al.*, 1998).

Os fungos filamentosos estão entre os microrganismos explorados para a produção de produtos biotecnológicos, sendo utilizados na produção de pequenas moléculas, como antibióticos e ácidos orgânicos, enzimas e materiais sustentáveis (WOSTEN, 2019). As enzimas de origem fúngicas são especialmente interessantes, pois, quando comparadas com as obtidas de bactérias, são mais fáceis de extrair, além do fato desses microrganismos apresentarem a capacidade de crescer em materiais orgânicos de baixo custo (SOUZA *et al.*, 2015). Outra vantagem dos fungos filamentosos é que muitos secretam proteases para o meio externo com a finalidade de degradar proteínas. O custo final de produção para obtenção de produtos de natureza extracelular é menor, pois ao dispensar o rompimento celular, reduz os contaminantes do meio, o que demanda menos etapas para a purificação (PESSOA-JR *et al.*, 2020).

Dentre os fungos filamentosos, os pertencentes ao gênero *Aspergillus* merecem destaque, uma vez que apresentam distribuição cosmopolita e, por terem um papel essencial nos ciclos biogeoquímicos, são capazes de secretar uma ampla diversidade de enzimas em grande quantidade (SANTOS *et al.*, 2020; SHI *et al.*, 2016; WOSTEN, 2019). Além disso, estão entre os fungos mais presentes no solo da Caatinga, sendo considerados tolerantes as mais diversas variações ambientais (MOURA, 2007). A importância desses fungos como produtores de enzimas proteolíticas vem sendo descrita por vários pesquisadores. Silva *et al.* (2016) investigaram trinta e quatro linhagens do gênero *Aspergillus* e todas apresentaram atividade proteolítica. Chimbekujwo *et al.* (2020) obtiveram protease a partir de *A. brasiliensis* BCW2, Silva *et al.* (2018) a partir de *A. tamarii* URM4634 e Murthy *et al.* (2019) utilizando *A. oryzae*. Apesar de serem reconhecidos produtores de proteases, poucas espécies de *Aspergillus* são exploradas comercialmente, sendo *A. oryzae* e *A. niger* as principais espécies de interesse industrial (SANTOS *et al.*, 2018).

A fermentação submersa (FS) é a principal forma de produção de enzimas por microrganismos devido ao fácil controle de parâmetros físico-químicos, como pH, temperatura e oxigênio dissolvido, além de ser uma técnica mais prática para escalonamento a nível industrial (SOCCOL *et al.*, 2017). Um aspecto importante a ser

considerado na fermentação é o tipo de substrato a ser utilizado, aproximadamente um terço dos custos de produção estão concentrados no processo fermentativo, deixando ainda mais evidente a necessidade de estabelecer um substrato de baixo custo que forneça proporções adequadas de nitrogênio e carbono (BELMESSIKH, 2013). A utilização de resíduos oriundos da agroindústria tem se mostrado uma alternativa promissora, uma vez que conservam boa parte de seus nutrientes de origem, conseguindo suprir as demandas da indústria, e agregam valor ao produto por apresentar uma alternativa ecológica. O uso de resíduos agroindustriais na FS já foi descrito por alguns autores na produção de diversas enzimas, como lipases produzidas por *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. a partir de efluentes de laticínios (ROVEDA *et al.*, 2010), celulase e xilanase produzida por *Aspergillus* sp. utilizando resíduo de algodão girassol e macaúba como substrato (SANTOS, 2013) e proteases obtidas pela fermentação de *Rhizopus microsporus* em meio contendo farelo de arroz (SARAO *et al.*, 2010).

A produção de enzimas microbianas é um dos principais setores da biotecnologia industrial (ORLANDELLI, 2012) e, segundo relatório da FIORMarkets (2019), é estimado um crescimento de 8,83% para esse segmento e um aumento no mercado global de enzimas, passando a movimentar cerca de 13,79 bilhões de dólares até 2026 (FIORMARKETS, 2019), mantendo proteases em primeiro lugar no mercado mundial de enzimas microbianas aplicadas industrialmente. Contudo, a produção destas enzimas ainda é insuficiente para atender essa demanda crescente (SUNDARARAJAN *et al.*, 2011).

Neste sentido, visando as aplicações biotecnológicas dessas enzimas é necessário intensificar e explorar a produção de proteases de origem microbiana, bem como elucidar metodologias que reduzam os custos de produção. Sendo a utilização de resíduos agroindustriais provenientes de indústrias alimentícias uma alternativa sustentável e que pode reduzir os custos para a produção de proteases de origem microbianas.

## 2 | OBJETIVOS

Produzir proteases a partir do *Aspergillus tamarii* Kita UCP 1279, isolado do bioma da Caatinga, utilizando a fermentação submersa e diferentes fontes de nitrogênio (resíduos agroindustriais), variando as suas concentrações.

## 3 | METODOLOGIA

### 3.1 Microrganismo

A linhagem *Aspergillus tamarii* Kita UCP 1279 (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado/ Cadastro N° AA30B0B) foi isolada do solo da Caatinga (Região Nordeste do Brasil) e depositado na coleção de culturas da Universidade Católica de Pernambuco (UCP). Para este trabalho o fungo foi

reativado da solução de óleo mineral em meio caldo glicosado, segundo a metodologia de Nascimento *et al.* (2015), sendo mantido em um agitador orbital por 72 horas em 120 rpm a 30°C, permitindo assim o desenvolvimento do microrganismo. Em seguida, após a reativação o fungo filamentososo, foi inoculado em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) sendo mantido por 7 dias em um BOD a 30°C, permitindo assim a sua esporulação.

### 3.2 Produção de proteases por fermentação submersa

Para a fermentação submersa foi utilizado a metodologia de Porto *et al.* (1996), em que o meio MS-2 foi modificado pela inserção de farinha de soja, da casca de maracujá e laranja. Com objetivo de identificar as melhores condições para a produção de proteases foi realizado um planejamento fatorial de 2<sup>2</sup> variando as concentrações das farinhas (1,0%; 3,0% e 5,0%) e os tipos de fontes de nitrogênio (farinha da casca de laranja, maracujá e de soja), conforme apresentado na Tabela 1. O microrganismo foi inoculado em agitador orbital em 120 rpm a 30°C por 48 horas.

Variáveis	Níveis		
	Menor (-1)	Central (0)	Maior (+1)
Tipos de farinha	Laranja	Soja	Maracujá
Concentração de farinha (%)	1	3	5

Tabela 1. Matriz do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> para produção de protease pelo fungo *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279.

### 3.3 Extração enzimática

Para obtenção do extrato bruto, oriundo da fermentação submersa, foi realizada uma filtração a vácuo utilizando papel filtro (Watman n°1), com o objetivo de separar a biomassa fúngica do sobrenadante, o sobrenadante foi utilizado para determinar atividade proteolítica.

### 3.4 Determinação da atividade proteolítica

A atividade proteásica foi determinada de acordo com o método de Ginther *et al.* (1979). A mistura de reação conteve 0,25 mL do substrato (azocaseína 1% p/v em tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,0) e 0,15 mL da amostra. Esta mistura foi incubada por 1 hora em estufa a 37°C e a reação interrompida pela adição de 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% p/v. Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 5 min a 10000 rpm. Dos sobrenadantes, foram pipetados 0,8 mL e transferidos para eppendorfs com 0,2 mL de hidróxido de sódio 1M. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro, com comprimento de onda de 420 nm.

## 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso de fermentação submersa para cultivo de *Aspergillus tamarii* Kita UCP 1279 solidificou esta metodologia como pertinente para a utilização de resíduos agroindustriais para obtenção de enzimas, corroborando com trabalhos presentes na literatura (SARAO *et al.*, 2010; SANTOS, 2013). Exemplos da capacidade nutritiva de diferentes resíduos em meio líquido pode ser observada na figura 1.

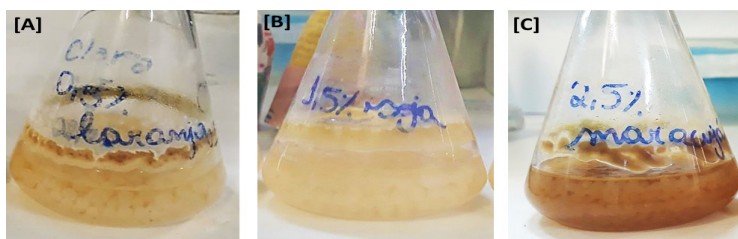


Figura 1. Diferentes fontes de nitrogênio utilizadas em fermentação submersa (FS) de *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279. [A] FS com meio de resíduo de farinha de casca de laranja; [B] FS com meio de resíduo de farinha de soja; [C] FS com meio de resíduo de farinha de casca de maracujá.

Os resultados da atividade proteásica obtida pela fermentação submersa do *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279 utilizando diferentes resíduos agroindustriais e variando as suas concentrações estão expressos na tabela 2. A maior atividade proteásica foi encontrada na condição com 3% de farinha de soja obtendo 24 U/mL, sendo observada uma queda de até 72,25% quando utilizado farinha de casca de laranja na concentração de 1% e 53,33% quando utilizado farinha de casca de maracujá também com 1% de concentração. No geral, as fermentações que utilizaram 1% de concentração da fonte de nitrogênio obtiveram as menores atividades. Neste sentido, é possível compreender na figura 2, que das variáveis estudadas a única que influenciou diretamente na produção foi o tipo de substrato.

Ensaio	Tipo de substrato	Concentração (%)	Atividade (U/mL)
1	Maracujá	1	12,80
2	Laranja	1	6,66
3	Maracujá	5	16,66
4	Laranja	5	8,53
5 (C)	Soja	3	24

6 (C)	Soja	3	21
7 (C)	Soja	3	22

Tabela 2. Resultados das atividades proteásicas em 48 horas de fermentação submersa por *Aspergillus tamarii* Kita UCP 1279 com diferentes substratos utilizando planejamento fatorial 2<sup>2</sup>

Em um estudo para produção de proteases pela fermentação submersa do *Aspergillus oryzae* NRRL 2220 utilizando como resíduo o bagaço de tomate, em condições de otimização com análises experimentais, estatísticas e cinéticas e em 96 horas de fermentação a máxima atividade proteolítica foi de 2343,5 U/g (BELMESSIKH *et al.*, 2013). No entanto, no presente estudo ainda não foi realizada nenhuma otimização na produção de proteases, sendo o maior resultado de produção obtido com o resíduo de farinha de soja na concentração 3% de 24 U/mL considerado bom, visto que o tempo de fermentação foi em apenas 48 horas.

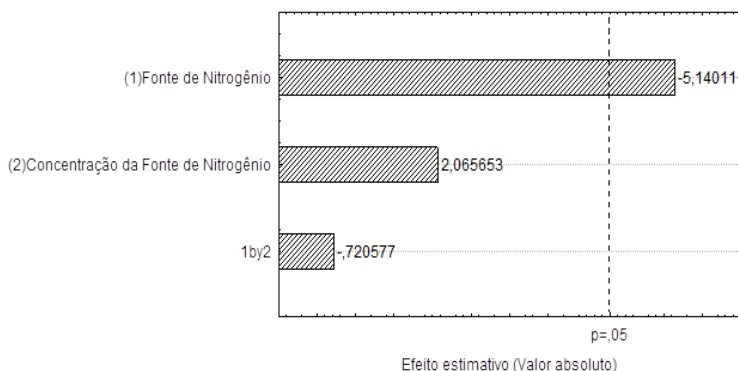


Figura 2: Gráfico de Pareto demonstrando a influência das variáveis tipo de substrato e concentração na produção de protease por *Aspergillus tamarii* Kita UCP 1279.

Observa-se que a produção de proteases depende não somente da disponibilidade de carbono e das fontes de nitrogênio presentes no meio, mas também sofre influência do tipo de substrato. De acordo com Kucera *et al.* (1981), embora as fontes de nitrogênio extremamente complexas sejam as mais utilizadas para a produção de proteases, a exigência de um substrato específico difere de organismo para organismo e que geralmente os fungos produzem mais enzimas proteolíticas na presença de substratos com fontes nitrogenadas proteicas do que com fontes de nitrogênio inorgânicas. Contudo, a utilização de fontes alternativas ricas em conteúdo protéico é um caminho viável e ecologicamente correto, podendo ser vantajoso e aplicável na biotecnologia e possivelmente na indústria. Há relatos na literatura da utilização de fontes de nitrogênio orgânico associado a um

substrato de peptona e extrato de levedura que promoveu um efeito máximo na produção de enzimas proteolíticas (PATEL *et al.*, 2005).

## 5 | CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados o fungo *Aspergillus tamarii* Kita UCP 1279 é produtor de proteases e o tipo de substrato pode influenciar diretamente na produção de biomoléculas, especialmente as proteases. Afirmando a importância de utilizar ferramentas estatísticas para selecionar condições que favoreçam a produção de proteases ou biomoléculas de interesse biotecnológico.

## REFERÊNCIAS

BELMESSIKH, A. *et al.* **Statistical optimization of culture medium for neutral protease production by *Aspergillus oryzae*. Comparative study between solid and submerged fermentations on tomato pomace.** Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers., v. 44, n.3, p. 377–385, 2013.

CHIMBEKUJWO, K. I.; JA'AFARU, M. I.; ADEYEMO, O. M. **Purification, characterization and optimization conditions of protease produced by *Aspergillus brasiliensis* strain BCW2.** Scientific African., v. 8, p. e00398, 2020.

FIORMARKETS. **Enzymes Market by Type (Protease, Carbohydrase, Lipase, Polymerase and Nuclease, Others), Source, Application, Regions, Global Industry Analysis, Market Size, Share, Growth, Trends, and Forecast 2019 to 2026.** Report ID: 396080, 2019, 250p.

GINTHER, C. L. **Sporulation and the production of serine protease and cephamycin C by *Streptomyces lactamdurans*.** Antimicrobial Agents Chemother., v. 15, p. 522-526, apr, 1979.

GURUMALLESH, P. *et al.* **A systematic reconsideration on proteases.** International Journal of Biological Macromolecules., v. 128, p. 254-267, may. 2019.

KUCERA, M. *et al.* **The production of toxic protease by the entomopathogenous fungus *Metarhizium anisopliae* in submerged culture.** J Invertebr Pathol., v. 38, p. 33-38, 1981.

MOURA, E. R. **Fungos filamentosos isolados do solo de área de caatinga.** Dissertação de Mestrado - Pós-graduação em Biologia de Fungos. UFPE. 2007.

MURTHY, P. S. *et al.* **Modulation of coffee flavor precursors by *Aspergillus oryzae* serine carboxypeptidases.** Lwt, v. 113, n. 8, p. 108312, 2019.

NASCIMENTO, T. P. *et al.* **Production and Characterization of New Fibrinolytic Protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 in Solid-State Fermentation.** Advances in Enzyme Research, vol. 3, n. 3, p. 81–91, 2015.

ORLANDELLI, R. *et al.* **Enzimas de interesse industrial: Produção por fungos e aplicações.** Saúde e biol., v. 7, n. 3, p.97-103, set/dez. 2012.



- PATEL, R. *et al.* **Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: Production and optimization.** *Process Biochemistry*, v. 40, p. 3569-3575, 2005.
- PESSOA-JR, A. *et al.* Rompimento celular. In. KILIKIAN, B. V.; PESSOA-JR, A. (Coord.). **Purificação de produtos biotecnológicos: operações e processos com aplicação industrial.** 2ª ed. São Paulo: BLUCHER, 2020, p.67-103.
- PORTO, A.L.F. *et al.* **Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing on the soy bean flour medium.** *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 60, n. 2, p.115-122, may/jul 1996.
- RAO, M.B. *et al.* **Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases.** *Microbiology and Molecular Biology.*, v. 62, p. 597-635,1998.
- ROVEDA, M. *et al.* **Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.30, n.1, 2010.
- SANTOS, A. F. A. *et al.* **Bioprospecção de enzimas produzidas por *Aspergillus tamarii* URM 4634, isolado do solo da Caatinga, por fermentação em estado sólido.** *Brazilian Journal of Development*, v. 6, p. 25663-25676, 2020.
- SANTOS, P. S. *et al.* **Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: Uma revisão sistemática.** *The Journal of Engineering and Exact Sciences*, v. 4, n. 2, p. 0181–0188, 2018.
- SANTOS, R. S. dos. **Produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por fungos filamentosos utilizando resíduos da cadeia do biodiesel como fonte de carbono.** Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Ciências Exatas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2013.
- SARAO, L. K. *et al.* **Production Of Protease By Submerged Fermentation Using *Rhizopus Microsporus* Var *Oligosporus*.** *Internet Journal of Microbiology.* v.9, n. 1, 2010.
- SHI, C. *et al.* **Physicochemical Properties Analysis and Secretome of *Aspergillus niger* in Fermented Rapeseed Meal.** *PLoS One.*, v. 11, n. 4, apr 2016.
- SILVA, O. S. *et al.* **Novel Protease from *Aspergillus tamarii* URM4634: Production and characterization using inexpensive agroindustrial substrates by solid-state fermentation.** *Advances in Enzyme Research*, v. 4, n. 4, p. 125-143, 2016.
- SILVA, O. S. *et al.* **Purification and characterization of a novel extracellular serine-protease with collagenolytic activity from *Aspergillus tamarii* URM4634.** *Elsevier B.*, v. 117, 2018.
- SOCCOL, C. R. *et al.* **Recent developments and innovations in solid state fermentation.** *Biotechnology Research and Innovation*, v. 1, p. 52-71, 2017.
- SOUZA, P. M. *et al.* **A biotechnology perspective of fungal proteases.** *Braz. J. Microbiol.*, v. 46. Apr./ June 2015.

SUNDARARAJAN, S. *et al.* **Alkaline protease from *Bacillus cereus* VITSN04: Potential application as a dehairing agent.** Journal of Bioscience and Bioengineering. v. 111, n. 2, p. 128–33, 2011.

VERMELHO, A.B. *et al.* **Enzimas proteolíticas: aplicações biotecnológicas,** 1ª edição. Rio de Janeiro. Editora: Embrapa, p. 273-287, 2008.

WOSTEN, H. A. B. **Filamentous fungi for the production of enzymes, chemicals and materials.** Current Opinion in Biotechnology., v. 59, p. 65-70, 2019.

# CAPÍTULO 14

## PRODUCTION OF YEAST BIOMASS AND CELL WALL TO OBTAIN $\beta$ GLUCANS FOR A BIOTECHNOLOGICAL PURPOSE

*Data de aceite: 01/10/2020*

**Carina Maricel Pereyra**

Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Ciencias Exactas, Físico Químicas y Naturales, Departamento de Microbiología e Inmunología. Instituto para el Desarrollo Agroindustrial y de la Salud. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

**ABSTRACT:** Considering that the composition of the yeast cell wall can vary with respect to different growth conditions, the objective of this study was to determine the influence of additives (EDTA, SDS, NaCl) on the production of yeast biomass, the percentage of cell wall and its composition, in order to obtain  $\beta$ -glucan. The extraction of the cell wall was carried out by an alkaline extraction technique and the study of the composition was carried out using infrared (IR) spectroscopy. The production of biomass and cell wall was variable, depending on the strain and the treatments studied. The IR spectra of each cell wall showed three characteristic regions of the wall (polysaccharides, proteins and lipids). In addition, it was possible to determine the chemical groups corresponding to  $\beta$ -glucan and amides I and II corresponding to chitin. The glucans content, and the  $\beta$ -glucan/chitin ratio in particular, varied with the yeast strain and with the additive studied. Future studies must be performed to extract the  $\beta$ -glucans and determine their concentration in each cell wall. The optimization of the production

of cell wall and its components from yeast strains will allow its application in obtaining  $\beta$ -glucans for the food, pharmacological and cosmetic industries.

**KEYWORDS:** Additives,  $\beta$ -glucans, Cell Wall, Yeast.

### PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE LEVEDURA E PAREDE CELULAR PARA OBTENÇÃO DE $\beta$ GLUCANOS PARA UM PROPÓSITO BIOTECNOLÓGICO

**RESUMO:** Considerando que a composição da parede celular da levedura pode variar em função de diferentes condições de crescimento, o objetivo deste trabalho foi determinar a influência dos aditivos (EDTA, SDS, NaCl) na produção de biomassa de levedura, a porcentagem de parede celular e sua composição, a fim de obter  $\beta$ -glucano. A extração da parede celular foi realizada pela técnica de extração alcalina e o estudo da composição por espectroscopia de infravermelho (IV). A produção de biomassa e parede celular foi variável, dependendo da linhagem e dos tratamentos estudados. Os espectros de IV de cada parede celular mostraram três regiões características da parede (polissacarídeos, proteínas e lipídeos). Além disso, foi possível determinar os grupos químicos correspondentes à  $\beta$ -glucano e as amidas I e II correspondentes à quitina. O teor de glucanos, e a razão  $\beta$ -glucano/quitina em particular, variaram com a cepa de levedura e com o aditivo estudado. Estudos futuros devem ser realizados para extrair os  $\beta$ -glucanos e determinar sua concentração em cada parede celular. A otimização da produção

da parede celular e seus componentes a partir de cepas de leveduras permitirá sua aplicação na obtenção de  $\beta$ -glucanos para a indústria alimentícia, farmacológica e cosmética.

**PALAVRAS - CHAVE:** Aditivos,  $\beta$ -glucanos, Parede Celular, Levedura.

## 1 | INTRODUCTION

Yeasts are unicellular fungi that can be found in a variety of environment, approximately 900 species of yeast have been described, although the species studied in depth to be used in biotechnology are scarce. Among the most important yeast species, *Saccharomyces cerevisiae* stands, which is the yeast most used in industrial processes. In recent years, other so-called non-conventional yeast species have become increasingly relevant due to their positive contribution to both food and beverage fermentation. Some of these yeast genera include *Pichia*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces* and *Issatchenkia* that participate in cider and wine fermentations, dairy products, bread production, sausages and various vegetable fermentations (Romano et al., 2006).

## 2 | YEAST BIOTECHNOLOGY

Biotechnology is any technological application that uses biological systems and living organisms or derivatives to make or modification of products and processes for specific uses. The biotechnological bases are the engineering, physics, chemistry, biology, human and veterinary medicine; and the field of this science has a great impact on pharmacy, medicine, food science, solid, liquid, gaseous waste treatment and agriculture (OECD, 2005).

Traditional yeast biotechnology has been carried out since the beginning of human history through the baking of bread, the preparation of alcoholic beverages and the cultivation of food or the raising of domestic animals. *Saccharomyces cerevisiae* has been described as humanity's most domesticated organism and is still the most exploited yeast species in the industry today. But recent developments in molecular biology have given biotechnology new meaning, new prominence, and new potential. (<https://www.thebeertimes.com/saccharomyces-cerevisiae-y-las-claves-para-el-estudio-de-las-ciencias-de-life/>).

Yeasts are the leading producer of biotech products worldwide, exceeding the production, capacity and economic income of any other group of industrial microorganisms. The global annual production of *S. cerevisiae* is over 1 million tons (Zymanczyk- Duda et al., 2017). Of all the yeast species studied, only a dozen is used on an industrial scale. On the other hand, around 70 to 80 laboratory scale species have been shown to have potential value in biotechnology (Deak, 2009; Kurtzman et al., 2011).

MAIN SPECIES OF BIOTECHNOLOGICAL IMPORTANCE	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Scheffersomyces stipitis</i>
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Picchia spp.</i>
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Rhodotorula spp.</i>
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Rhodospodium spp.</i>
<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>
<i>Lipomyces spp.</i>	<i>Candida spp.</i>
<i>Saccharomycopsis spp.</i>	<i>Trichosporon spp.</i>
<i>Debaromyces hansenii</i>	<i>Blastobotryss adeninivornas</i>
<i>Ogataea polymorpha</i>	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>
<i>Komagataella pastoris</i>	

Boekhout (2003). The Yeasts. A Taxonomy Study. Kurtzman, Fell, Boekhout 2011.

### 3 I YEAST CELL WALL AND POLYSACCHARIDES

Yeast cells are surrounded by a rigid cell wall (CW) that provides physical and osmotic protection, as well as determining cell shape and integrity during cell growth and division; however, it is a dynamic structure that can adapt to physiological and morphological changes (Smith, 2000; Klis et al., 2002). This structure represents between 20 and 25% of the dry weight of the cell and consists of approximately 85 to 90% of polysaccharides and 10 to 15% of proteins (Walker, 2000).

Three different groups can be distinguished within the CW polysaccharides: on the one hand, mannose polymers or mannanoproteins that are a heterogeneous group of glycoproteins and can represent approximately 40% of the dry weight of the CW; on the other hand, the glucose polymers or  $\beta$ -glucan that constitute 60% of the dry weight of the CW, and can be differentiated, according to the type of glycosidic bonds, in  $\beta$  (1,3) and  $\beta$  (1,6) glucans, which represent 85% and 15% of these polysaccharides, respectively; and finally, the N-acetylglucosamine polymers that make up chitin and that constitute up to 2% of the dry weight of the CW (Nguyen et al., 1998; Klis et al., 2002; Aguilar-Uscanga and François, 2003; Kath and Kulicke, 1999; Suphantharika et al., 2003). The chemical structure of carbohydrates in the CW is shown in **Figure 1**.

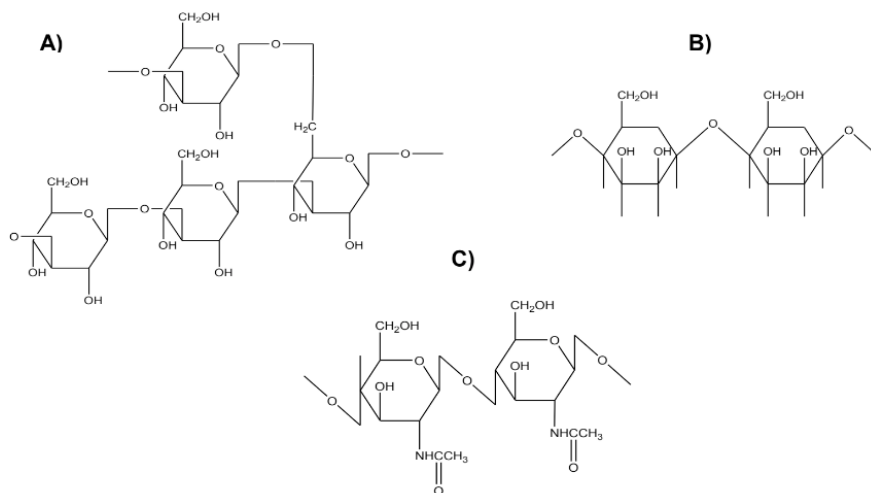


Figure 1. Chemical structure of polysaccharides from yeast cell walls. A)  $\beta$  glucans, B) Mannans and C) chitin.

Cell wall polysaccharides extracted from yeast have been described as components with important biological properties in addition to their structural function, as immunomodulators (Novak and Vetvicka, 2009; Mehdi and Hasan, 2012), with anti-inflammatory and antimicrobial (Vetvicka and Vetvickova 2010), antiproliferatives (Salvador et al., 2008) and antioxidants properties (Jaehrig, et al., 2007; Machová and Bystrický, 2013; Qiling et al., 2017). Furthermore, the physical and chemical properties of  $\beta$ -glucans and mannans have special interest over the years for different industrial applications (Zhu et al., 2015; Galineri et al., 2017). Studies have been carried out on the use of  $\beta$  glucans from different origins in the food industry (Kittisuban et al., 2014; Lazaridou et al., 2014; Rinaldi et al., 2015), in the cosmetic industry (Vacharaprechakul et al., 2007; Kanlayavattanakul and Lourith, 2008; Medeiros et al., 2013; Du et al., 2014) and in medicine (Belcarz et al., 2013; Samuelsen et al., 2014; Levitz, 2014).

#### 4 | NUTRITIONAL FACTORS THAT INFLUENCE THE COMPOSITION OF THE YEAST CELL WALL

The composition of polysaccharides, the structure and the thickness of the cell wall vary according to the different species and strains, the stage of the cell cycle and environmental conditions (Nguyen et al., 1998; Aguilar-Uscanga and François, 2003; Bähler, 2005; Smits et al., 1999; Magnelli et al., 2002) (Table 1).

Knowledge about its composition and the factors that influence it is of relevance, due to the increased commercial interest in the production of  $\beta$ -glucans and mannans for the different industries (Donzis, 1996; Jozef et al., 1999; Zhu et al., 2015) and, conversely, the

need to reduce wall thickness to optimize a more effective and rapid release of endogenous biomolecules (Daran et al., 1997).

The most important factors for microbial growth are: the energy source and the carbon source and its use. The economic evaluation of the yeast production process suggests that the main contributor to the global cost is the carbon source. In recent years, different researchers have worked on obtaining CW and  $\beta$ -glucans using different carbon sources (Table 1). In biomass production, some criteria must be taken into account for the choice of the substrate. These are price, availability and abundance, toxicity, carbohydrate content and their use by microorganisms (Sharma et al., 2014).

FUNGI	SPECIES	CARBON SOURCE	REFERENCE
Yeast	<i>S. cerevisiae</i>	YPD (EDTA, SDS and ClNa)	Naruemon y col., 2013
	<i>S. cerevisiae</i>	YPD	Plata y col., 2013
	<i>S. cerevisiae</i>	Mineral medio (glucose, mannose, galactose, sucrose, maltose, ethanol)	Aguilar Uscanga y col. 2005
	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. boulardi</i>	YPD, DDGse (dried distiller grains with solubles extract)	Pereyra et al., 2018
	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	YPD, DDGse (dried distiller grains with solubles extract)	Pereyra et al., 2017
Mushrooms	<i>Pleurotus sp.</i>	Olive mill solid waste (OMSW)	Avni et al., 2017
	<i>Lentinus edodes</i>	Olive mill waste (OMW) and phenols	Reverberi et al., 2004
	<i>Lentinus edodes</i>	Substrates with a high content of polyphenolic compounds	Ooi and Liu, 2000

Table 1. Use of different carbon sources and / or additives for obtaining cell wall and  $\beta$  glucans from fungi.

## 5 | MATERIALS AND METHODS

### 5.1 Yeast Isolation

Yeast strains were isolated from fifteen (15) samples of whole corn. Ten (10) grams of each sample were ground, weighed and added to 90 mL of sterile peptone water contained in an Erlenmeyer flask, obtaining a  $10^{-1}$  dilution. Serial dilutions in sterile peptone water were made and 0.1 mL aliquots were inoculated in duplicate onto yeast dextrose extract (YPD) medium containing chloramphenicol (2 mL of a solution of 250 mg / 100 mL 95% ethanol). The plates were incubated at 28°C for 24-48 h.

## 5.2 Molecular Identification Of Yeast Strains

### Yeasts culture and DNA extraction

Yeast strains were maintained on plates containing YPD medium. Several colonies were transferred to a sterile microtube by duplicate. The pellet was frozen with liquid nitrogen for 5 min. Fungal DNA was extracted using a hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB 2%) (2% CTAB-Sigma; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl 1M-pH 8) preheated to 65°C and 10  $\mu\text{L}$  of 2-mercaptoethanol (Merk) procedure following the methodology proposed by Leslie and Summerell (2006). Extraction residues were resuspended in 100  $\mu\text{L}$  of 1X TE buffer (10mM Tris-HCl, 1.0mM EDTA, pH 8), and stored at -20°C. DNA quantification was performed using a Nanodrop 2000 Spectrophotometer kit (Thermo Scientific).

### Obtaining profiles using PCR fingerprinting

*Microsatellite-primed PCR.* The one step PCR-fingerprinting method was performed using the microsatellite primer (GTG)<sub>5</sub>. PCR reactions were made with 20-30 ng of fungal DNA in a total volume of 25  $\mu\text{L}$  of 1  $\times$  reaction buffer containing 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.25 U Taq DNA polymerase (5 U. $\mu\text{L}^{-1}$ , Invitrogen by Life Technologies, Buenos Aires, Argentina), 0.2 mM of each dNTP and 0.6  $\mu\text{M}$  of (GTG)<sub>5</sub> primer. A negative control, containing all reagents without fungal DNA, was included in every set of reactions. PCR was conducted according to the following cyclic conditions: initial denaturation at 94°C for 3 min, followed by 35 cycles consisting of 94°C for 45 s, 54°C for 45 s and 72°C for 1 min, and a final extension step of 72°C for 10 min, and then held at 4°C indefinitely. DNA band patterns were visualized after electrophoretic run on 1.5% agarose gel stained with 0.5  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  ethidium bromide and gels were photographed using a MiniBIS Pro, DNR Bioimaging systems analyzer. The fragment sizes were measured by comparison with DNA 100-bp ladder (Invitrogen by Life Technologies, Buenos Aires, Argentina) whose reference bands vary between 100 and 2072 bp. In addition, DNA profiles of *Saccharomyces* sp. and *Candida* sp. strains were used for comparison.

## 5.3 Biomass Production Of Yeast Strains To Obtain Cell Wall

For the biomass production, three yeast strains were selected that are beneficial according to the literature. The strains were maintained on malt extract agar (MEA).

### Yeast biomass production

A concentration of  $1.10^7$  cells. $\text{mL}^{-1}$  (1 mL) of yeast was inoculated into *Erlenmeyer*-type flasks containing 100 mL of YPD broth at 28°C for 24 h in orbital shaker (150 rpm). At the end of the incubation time, the biomass was centrifuged at 5000 rpm for 5 min. The sediment was dried in a forced air oven to recover the biomass destined for extraction from the cell wall.



## Influence of the addition of EDTA, SDS and CINa

The influence of the additives was determined on: I) biomass production and the percentage of CW, II) the production of  $\beta$  glucans, and III) and the  $\beta$  glucan/chitin ratio in the CW of the studied strains.

YPD medium was adjusted to pH 4 and supplemented with different concentrations of EDTA, SDS and CINa, according to Nareumon et al., 2013 (**Table 2**). Each medium was inoculated with 1 mL of a concentration of  $1.10^7$  cells.mL<sup>-1</sup> of yeast and incubated at 28°C for 24 h in orbital shaker (150 rpm). At the end of the incubation time, the culture media were centrifuged. The sediment (biomass) was dried in a forced air oven to recover the biomass destined for the extraction of the CW. All tests and combinations were performed in duplicate.

Additives (ppm)	Treatments						
	T1 (YPD)	T2	T3	T4	T5	T6	T7
EDTA	0	0	50	0	5	0	5
SDS	0	100	0	0	10	20	10
CINa	0	0	0	30.000	0	3000	3000

Table 2. Concentration of additives used in YPD medium.

## Preparation of the yeast cell wall

Biomass production was performed following the methodology of Nguyen et al., 1998, with some modifications. The cultures were incubated at 28°C in an orbital shaker (150 rpm). Yeast cells were harvested by centrifugation at 5000 rpm for 10 min, washed three times with water to remove traces of culture medium and then twice more with 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 8.5 (at 4°C). The biomass was dried at 60°C in forced air oven until constant weight.

Yeast cells were suspended in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 8.5, and an equal volume of glass beads (0.45 mm diameter). They were cooled to 4°C and broken by mechanical shaking for 30 s, after which the homogenate was cooled and disrupted for another 30 s. This procedure was repeated five times. The glass beads were removed from the homogenate by decanting, and the cell walls were separated by centrifugation at 5000 rpm for 15 min. The cell walls were washed five times with 0.1 M phosphate buffer, pH 8.5, and then washed a further four times with distilled water. The temperature was kept below 4°C during all operations. The CW was dried at 60°C in forced air oven until constant weight.

## 5.4 Study Of The Composition Of The Cell Wall

To verify the variation in the composition of the CW under the influence of the

different additives (EDTA, SDS, CINA) infrared spectroscopy (IR) was performed. The dried CW was mixed with KCl (1 mg CW with 200 mg KCl). This mixture was ground in an agate mortar, finally making the tablet was performed under pressure ( $\approx 15 \text{ ton.cm}^{-2}$ ) and applying dynamic vacuum for 15 min. Measurements were performed in a Nicolet FTIR Impact 400 spectrometer. For data acquisition and processing the software OPUS was used. The spectra were the result of an accumulation of 200 measurements, to increase signal/noise ratio, and were measured between 4000 and 400  $\text{cm}^{-1}$  with a resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$ .

## 5.5 Statistic Analysis

Assays were performed in duplicate for each treatment. An analysis of variance (ANOVA) was performed. When the analysis was statistically significant, the Duncan test was used to determine the importance of each individual parameter and its interactions at  $p \leq 0.05$ . For the analysis of the data, the Info Stat program for Windows version 2015 was used.

## 6 | RESULTS

### 6.1 Isolation And Identification

Twenty-five (25) yeast strains were isolated from the 15 samples analyzed. DNA extraction and fingerprinting of all strains was performed. Two strains with the band profile of *Saccharomyces* sp. and one strain with the band profile similar to that obtained for *Candida* sp. were selected. In a future study, the sequencing of the strains will be carried out to determine specifically what species they are.

### 6.2 Biomass And Cell Wall Production

**Table 3** shows the biomass production and the CW percentage of the studied strains. The biomass production was higher in treatment 4 (with CINA) for the strain *Saccharomyces* sp. 1 (0.87 g/ 100 mL) and in treatment 5 (EDTA and SDS) for the remaining strains (0.86 g/ 100 mL for *Saccharomyces* sp. 2 and 0.79 g/ 100 mL for *Candida* sp.). The average percentage of CW ranged between 10.6 and 40.3% for *Saccharomyces* sp. 1, from 13.3 to 36.1% for *Saccharomyces* sp. 2, and from 27.4 to 40.5% for *Candida* sp. For *Saccharomyces* sp. 1, the percentage of CW was higher (40.3 - 39.1%) when it was grown only in YPD medium (T1) and in YPD with the 3 additives (T7). For *Saccharomyces* sp. 2 it was observed that in the T6 treatment (SDS - CINA) it achieved the highest percentage of CW (36.1%) and for *Candida* sp. the highest percentage of CW was when it was grown in YPD medium with EDTA and SDS (T5).

Treatments	Strains					
	<i>Saccharomyces</i> sp. 1		<i>Saccharomyces</i> sp. 2		<i>Candida</i> sp.	
	Biomass production (g/100 mL)	CW percentage (%)	Biomass production (g/100 mL)	CW percentage (%)	Biomass production (g/100 mL)	CW percentage (%)
T1	0.67	40.3	0.69	32.8	0.75	36.0
T2	0.62	10.6	0.58	13.3	0.62	27.4
T3	0.69	34.8	0.62	29.0	0.68	30.9
T4	0.86	25.6	0.73	30.1	0.68	33.8
T5	0.75	36.0	0.86	31.4	0.79	40.5
T6	0.61	26.2	0.72	36.1	0.74	33.8
T7	0.68	39.1	0.54	29.6	0.75	32.8

**Table 3.** Biomass production and cell wall (CW) percentage of *Saccharomyces* sp. 1, *Saccharomyces* sp. 2 and *Candida* sp. obtained from the different treatments.

T1: Control (YPD), T2: SDS, T3: EDTA T4: ClNa, T5: EDTA – SDS, T6: SDS – ClNa, T7: EDTA – SDS – ClNa.

The correlation between the amount of biomass (g/ 100 mL) and the amount of CW (g/ 100 mL) was determined for the 3 studied strains (**Figure 2**). For the strain *Saccharomyces* sp. 1 there was no correlation between both parameters. For the *Saccharomyces* sp. 2 and *Candida* sp. a positive correlation was observed between cell concentration and WC content, with values of  $R= 0.83$  and  $R= 0.94$ , respectively.

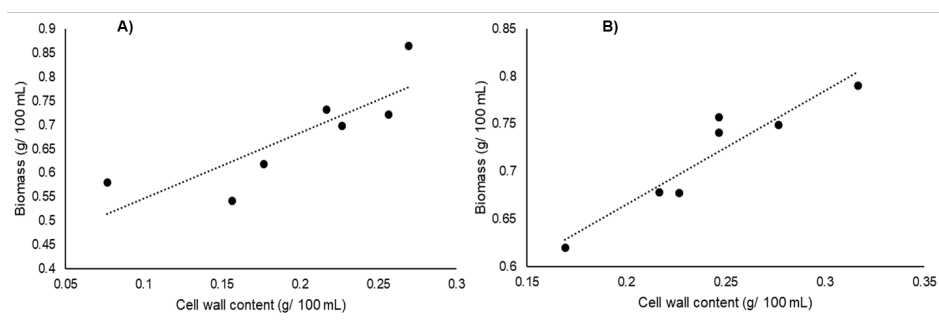


Figure 2. Correlation between cell wall content and amount of biomass. A) *Saccharomyces* sp. 2, B) *Candida* sp.

### 6.3 Study Of The Composition Of The Cell Wall

To verify the variation in the composition of the CW under the influence of different carbon sources, infrared (IR) spectroscopy was performed. The spectra of each CW in the 7 studied treatments show three regions corresponding to carbohydrates (950–1185  $\text{cm}^{-1}$

<sup>1</sup>), proteins (1480–1700  $\text{cm}^{-1}$ ) and lipids (2840 - 3,000  $\text{cm}^{-1}$ ). In the carbohydrate region, the  $\beta$ -glucans are observed and, in the protein region, the chitin is shown, represented by the bands amide I and amide II (**Figures 3, 4 and 5**). The 3 strains behaved differently in the 7 studied treatments. In addition to determine the presence of glucans and chitin, a semi quantitative comparison of the main infrared bands present in the 7 treatments for each strain was carried out to determine which of the additives present in the culture medium enhances the  $\beta$ -glucans production. **Figure 3** shows the infrared spectrum of the CW of the *Saccharomyces* sp. 1 strain where it showed a higher amount of carbohydrates (region between 1400 and 800  $\text{cm}^{-1}$ ) when it was cultivated in YPD medium with SDS (T2), in that treatment it is observed that the  $\beta$  glucans/chitin ratio is greater than 1. The combination of the three additives (EDTA, SDS, NaCl) in the culture medium (T7) also enhanced the production of  $\beta$ -glucans. **Figure 4** shows the infrared spectrum of the CW of the *Saccharomyces* sp. 2 strain. The T5 treatment (EDTA, SDS) was theoretically the best for obtaining carbohydrates, however, the  $\beta$  glucan/chitin ratio is of 1. By contrast, the treatment T2 (SDS) shows that the relation  $\beta$  glucans/chitin is greater than 1. The infrared spectrum of the CW of the *Candida* sp. strain is shown in **figure 5**. Treatments 1 and 2 are similar in terms of the influence on the production of  $\beta$  glucans. The  $\beta$  glucans/chitin relationship is 1 for all treatments, including T1 and T2.

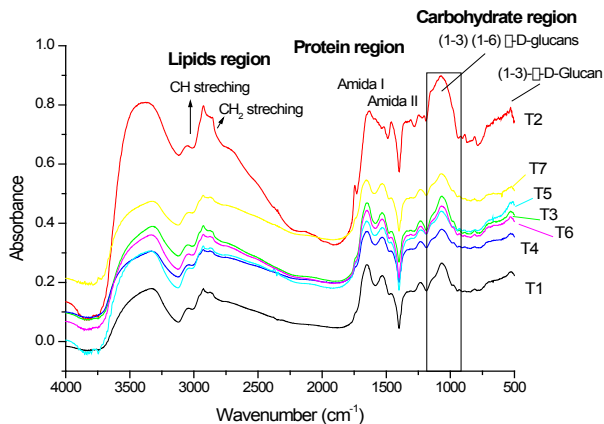


Figure 3. FTIR spectra of *Saccharomyces* sp. 1 cell wall grown in different treatments. T1: Control (YPD), T2: SDS, T3: EDTA T4: CINa, T5: EDTA – SDS, T6: SDS – CINa, T7: EDTA – SDS – CINa.

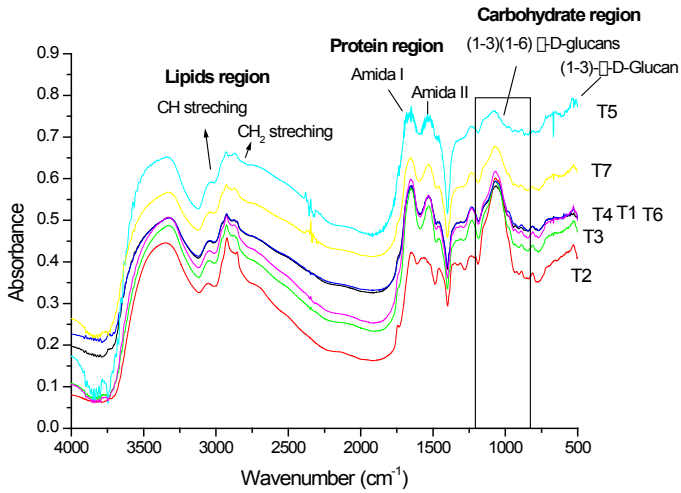


Figure 4. FITR spectra of *Saccharomyces* sp. 2 cell wall grown in different treatments. T1: Control (YPD), T2: SDS, T3: EDTA T4: ClNa, T5: EDTA – SDS, T6: SDS – ClNa, T7: EDTA – SDS – ClNa.

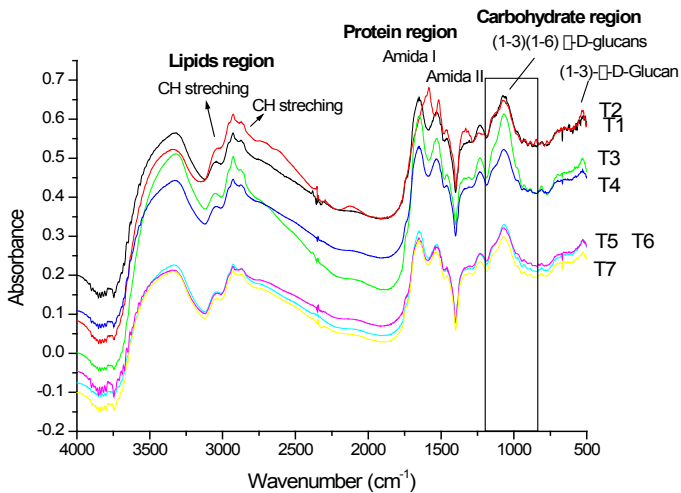


Figure 5. FITR spectra of *Candida* sp. cell wall grown in different treatments. T1: Control (YPD), T2: SDS, T3: EDTA T4: ClNa, T5: EDTA – SDS, T6: SDS – ClNa, T7: EDTA – SDS – ClNa.

## 71 DISCUSSION

This study evaluated the incorporation of 3 additives (EDTA, SDS and ClNa) to a culture medium such as YPD, to determine the influence on biomass production and cell wall content of *Saccharomyces* sp. 1; *Saccharomyces* sp. 2 and *Candida* sp. strains to be used in the future as producers of  $\beta$ -glucans.

The biomass concentration of the 3 studied strains in the 7 treatments was higher than those found by Serrat Díaz et al., (2017), they studied the influence of the carbon source, nitrogen source and temperature, where the average concentration ranged from 0.089 to 0.465 (g/ 100 mL). Dhanasekaran et al., (2011) studied the production of yeast biomass using pineapple residue, where a dry biomass content of 0.572 (g/ 100 mL) for *S. cerevisiae* and 0.492 (g/ 100 mL) for *C. tropicalis* was observed. Pereyra et al., (2018) studied the use of YPD medium and dried distiller grains with soluble extract (DDGse) for the biomass production of 3 probiotic strains (2 strains of *S. cerevisiae* and *S. boulardii*). These authors demonstrated a production between 0.405 to 0.5 (g/ 100 mL) in YPD and from 0.315 to 0.402 (g/ 100 mL) in DDGse. In this study the biomass production was used for the extraction of CW and to determine the content of  $\beta$ -glucans.

In general, the CW of *Saccharomyces cerevisiae*, is about 70 nm thickness that represent 20% of the whole cell's weight (Walker, 1999). The CW values found in this work varied between 10.6 to 40.3% (*Saccharomyces* sp. 1), from 13.3 to 36.1% (*Saccharomyces* sp. 2) and from 27.4 to 40.5% (*Candida* sp.). The average contents of CW were mostly within the range usually reported for yeast (Lipke and Ovalle, 1998). The composition of the CW can vary under different growth conditions, including the type of culture, carbon source, temperature, pH, and aeration (Aguilar-Uscanga and François, 2003; Naruemon et al., 2013). Aguilar Uscanga et al., (2005) studied the variation of polysaccharides composition present in the CW of *S. cerevisiae* using different carbon sources (glucose, mannose, galactose, sucrose, maltose, and ethanol) and found that the percentage of CW in dry weight was 10% for the culture made with 25% ethanol in the sucrose culture. Serrat Díaz et al., (2017) obtained CW percentages of *Kluyveromyces marxianus* from 12.3 to 27.6% when it was grown on different carbon sources (glucose, sucrose and lactose), different sources of nitrogens (peptone and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), different temperatures (30 and 40 ° C), pH (3.4 and 5.4) and in aerobiosis and microarobiosis. Nguyen et al., (1998) considered that it is important to maximize the performance of cell walls to minimize economic costs, if used commercially.

In this work, the composition of the extracted CW using FTIR was studied. The FTIR spectroscopy can be applied as a useful tool for the analysis of entire yeast cells providing a fast, effective, reagent-free, and simple method (Kuligowski et al., 2012). The FTIR spectroscopy is a rapid, precise, and accurate method, not requiring sample preparation, for the determination and quantification of carbohydrate composition of yeast (Novák and

Vetvi, 2009; Novák et al., 2012; Plata et al., 2013). The functional groups present on the cell surface can be identified by FTIR spectroscopy because each group has a unique energy absorption band (Jin and Bai, 2002). With this technique it was possible to study the carbohydrate variation of the CW under the influence of different additives.

The glucans content, and the  $\beta$ -glucan/ chitin ratio in particular, varied with the yeast strain and with the additive studied, suggesting that these species could potentially be sources of these polysaccharides. These considerations of the influence of growth parameters are important if the goal is to maximize CW yields, as would be the case in commercial situations. Furthermore, more studies are required on the chemical and physical properties of these polysaccharides to determine their structure and evaluate their industrial or medical applications. On the other hand, it is necessary to take into account the form of extraction of  $\beta$ -glucans and the different methods of determining the concentration in the CW.

## 8 | CONCLUSION

This study determined the influence of additives on yeast CW and biomass production. The 7 treatments were optimal for biomass production. The YPD medium (control) and the YPD with the 3 additives favored the percentage of CW for the *Saccharomyces* sp. 1 strain. For the *Saccharomyces* sp. 2 the optimal medium for the production of CW was YPD with SDS and ClNa, while for the *Candida* sp. strain it was the medium with EDTA and SDS.

The IR study of the 3 strains shows that the composition of CW contains chemical groups related to  $\beta$ -glucans. Future studies must be done to extract the  $\beta$ -glucans and determine their concentration in each CW.

The optimization of the production of CW and its components from yeast strains will allow its application in obtaining  $\beta$ -glucans for the food, pharmacological and cosmetic industries.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The author is grateful to the Universidad Nacional de Rio Cuarto, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina (CONICET), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT-FONCYT) which supported this study through grants.

## REFERENCE

AGUILAR USCANGA B, and FRANÇOIS J.M. 2003. **A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation.** *Letters in Applied Microbiology*, 37(3), 268–274.

AGUILAR USCANGA B, SOLIS PACHECO J, and FRANÇOIS J. 2005. **Estudio de la variación de la composición de los polisacáridos contenidos en la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.** e-Gnosis, 3, 0 núm.

AVNI S, EZOVE N, HANANI H, YADID I, KARPOVSKY M, HAYBY H, GOVER O, HADAR Y, SCHWARTZ B, DANAY O. 2017. **Olive Mill Waste Enhances  $\alpha$ -Glucan Content in the Edible Mushroom *Pleurotus eryngii*.** *International Journal of Molecular Sciences* 18(7):1564.

BÄHLER J. 2005. **Cell-cycle control of gene expression in budding and fission yeast.** *Annual Review of Genetics*, 39, 69–94.

BELCARZ A, GINALSKA G, PYCKA T, ZIMA A, ŚLÓWARCZYK A, POLKOWSKA I, PASZKIEWICZ Z, PIEKARCZYK W. 2013. **Application of  $\beta$ -1,3-glucan in production of ceramics-based elastic composite for bone repair.** *Open Life Sci.* 8, 534–548.

DARAN J.M, BELL W, and FRANÇOIS J. 1997. **Physiological and morphological effects of genetic alterations leading to a reduced synthesis of UDP-glucose in *Saccharomyces cerevisiae*.** *FEMS Microbiology Letters*, 153, 89–96.

DEAK T. 2009. **Ecology and biodiversity of yeasts with potential value in biotechnology.** En: T. SATYANARAYANA and G. KUNZE (eds.), **Yeast Biotechnology: Diversity and Application.** Springer Science-Business Media B.V.

DHANASEKARAN D, LAWANYA S, SAHA S, THAJUDDIN N, PANNEERSELVAM A. 2011. **Production of single cell protein from pineapple waste using yeast.** *Innovative Romanian Food Biotechnology.* (2011) 8, 26-32.

DONZIS B.A. 1996. **Substantially purified beta (1,3) finely ground yeast cell wall glucan composition with dermatological and nutritional uses.** US patent 5576015.

DU B, BIAN Z.X, AND XU B.J. 2014. **Skin health promotion effects of natural betaglucan derived from cereals and microorganisms: a review.** *Phytotherapy Research*, 28, 159-166.

FRANCOIS J.M. 2006. **A simple method for quantitative determination of polisaccharides in fungal cell walls.** *Nature Protocols*, 1 (6).

GALINARI E, ARAÚJO SABRY D, LANZI SASSAKI G, RIBEIRO MACEDO G, LOPES PASSOS F.M, CUQUETTO MANTOVANI H, OLIVEIRA ROCHA H.A. 2017. **Chemical structure, antiproliferative and antioxidant activities of a cell wall  $\beta$ -d-mannan from yeast *Kluyveromyces marxianus*.** *Carbohydrate Polymers* 157, 1298–1305.

JAEHRIG S.C, ROHN S, KROH L.W, FLEISCHER L.G, and KURZ T. 2007. **In vitro potential antioxidant activity of (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)-  $\beta$ -d-glucan and protein fractions from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4710–4716.



JOHNSON E.A, and ECHAVARRI ERASUN C. 2011. **The Yeast, a Taxonomy Study**, Chapter 3. Yeast Biotechnology.

JOHNSON E.A. 2013. **Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts—the ascomycetes**. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97, 503–517.

JOZEF S, KOGAN G, KACUROKOVA M, and MACHOVA E. 1999. **Microbial (1,3)-b-D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity**. *Carbohydrate Polymers*, 38, 247–253.

KANLAYAVATTANAKUL M, and LOURITH N. 2008. **Carboxymethylglucan in cosmetics**. *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal*, 3, 378-382.

KATH F, and KULICKE W.M. 1999. **Mild enzymatic isolation of mannan and glucan from yeast *Saccharomyces cerevisiae***. *Die Angewandte Macromoleculare Chemie*, 268, 59–68.

KITTISUBAN P, RITTHIRUANGDEJ P, and SUPHANTHARIKA M. 2014. **Optimization of hydroxypropylmethylcellulose, yeast b-glucan, and whey protein levels based on physical properties of gluten-free rice bread using response surface methodology**. *LWT Food Science and Technology*, 57, 738-748.

KLIS F, MOL P, HELLINGWERF K, and BRUL S. 2002. **Dynamic of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae***. *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 239–256.

KULIGOWSKI J, QUINTÁS G, HERWIG C, and LENDL B. 2012. **A rapid method for the differentiation of yeast cells grown under carbon and nitrogen-limited conditions by means of partial least squares discriminant analysis employing infrared micro-spectroscopic data of entire yeast cells**. *Talanta*.

KURTZMAN P.C, FELL J.W, BOEKHOUT T. (eds.). 2011. **The Yeasts, a Taxonomic Study 2011**, 5th Edition, Elsevier B.V

KWIATKOWSKI S, and KWIATKOWSKI S.E. 2012. **Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Glucan Polysaccharides – Occurrence, Separation and Application in Food, Feed and Health Industries**. Chapter 2.

LAZARIDOU A, BILIADERIS C, MICHA-SCRETTAS M, STEELE B. 2004. **A comparative study on structure–function relations of mixed-linkage (1 $\square$ 3), (1 $\square$ 4) linear  $\beta$ -D-glucans**. *Food Hydrocoll.* 18, 837–855.

LESLIE J, SUMMERELL B. 2006. **The *Fusarium* laboratory manual, First edit.** ed. Blackwell Publishing

LEVITZ S. 2014.  **$\beta$ -Glucan particles as a vaccine platform with intrinsic adjuvanticity** (469.3). *FASEB Journal*, 28, 469-473

LIPKE P.N, OVALLE R. 1998. **Cell wall architecture in yeast: New structure and new challenges**. *J. Bacteriol.*, 180, 3735–3740.

MACHOVÁ E, and BYSTRICKÝ S. 2013. **Antioxidant capacities of mannans and glucans are related to their susceptibility of free radical degradation.** *International Journal of Biological Macromolecules*, 61, 308–311.

MAGNELLI P, CIPOLLO J.F, and ABEIJON C. 2002. **A refined method for the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall composition and b-1,6-glucan fine structure.** *Analytical Biochemistry*, 301, 136–150.

MANUEL SERRAT-DÍAZ, JUAN A. VALLEJO-VIDAL, JOSÉ M. AGEITOS-MARTÍNEZ, GABRIEL LAURADÓ-MAURI, IMILCI URDANETA-LAFFITA, TOMÁS G. VILLA. 2017. **Influence of the Culture Conditions on the Growth and Cell Wall Content in a Flocculent Strain of *Kluyveromyces marxianus*.** *Rev. Cubana Quím.* Vol. 29, no.1, págs. 89-102, e-ISSN: 2224-5421.

MEDEIROS S.D.V, CORDEIRO S.L, CAVALCANTI J.E, MELCHUNA K.M, LIMA A.M, FILHO I.A., et al. 2013. **Effects of purified *Saccharomyces cerevisiae* (1/3)- $\beta$ -glucan on Vevnous ulcer healing.** *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 8142-8158.

MEHDI, A., and HASAN, G. 2012. **Immune response of broiler chicks fed yeast derived mannan oligosaccharides and humate against Newcastle disease.** *World Applied Sciences Journal*, 18, 779–785.

NARUEMON M, ROMANEE S, CHEUNJIT P, XIAO H.M.C, LANDSBOROUGH L.A, and PAWADEE M. 2013. **Influence of additives on *Saccharomyces cerevisiae*  $\beta$ -glucan production.** *International Food Research Journal*, 20(4), 1953-1959.

NGUYEN T.H, FLEET G.H, and ROGERS P.L. 1998. **Composition of the cell walls of several yeast species.** *Applied Microbiology Biotechnology*, 50, 206-212.

NOVÁK M, SYNYTSYA A, GEDEON O, SLEPICKA P, PROCHÁZKA V, SYNYTSYA A, BLAHOVEC J, HEJLOVÁ A, COPÍKOVÁ J. 2012. **Yeast (1-3),(1-6)-d-glucan films: Preparation and characterization of some structural and physical properties.** *Carbohydrate Polymers* 87, 2496–2504.

NOVÁK M, and VETVICKA V. 2009. **Glucans as biological response modifiers.** *Endocrine, Metabolic and Immune Disorders – Drug Targets*, 9, 67–75.

OCDE, Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico. 2005. *A Framework for Biotechnology Statistics*, OECD, Paris.

OOI VEC, LIU F. 2000. **Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide – protein complexes.** *Curr Med Chem*. 7:715–729.

PEREYRA C, GIL S, MAKITA M, CRISTOFOLINI A, MONGE M, BAINOTTI B, et al. 2017. **Potencial Biotecnológico de *Kluyveromyces marxianus* VM004 Para Adsorber Aflatoxina B1.** IX Congreso Latinoamericano de Micología. Agosto de 2017. Lima, Perú.

PEREYRA CM, GIL S, CRISTOFOLINI A, BONCI M, MAKITA M, MONGE MP, et al. 2018. **The production of yeast cell wall using an agroindustrial waste influences the wall thickness and is implicated on the aflatoxin B<sub>1</sub> adsorption process.** *Food Research International* 111, 306–313.

PLATA M.R, KOCH C, WECHSELBERGER P, HERWIG C, and LENDL B. 2013. **Determination of carbohydrates present in *Saccharomyces cerevisiae* using mid-infrared spectroscopy and partial least squares regression.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(25), 8241–8250.

REVERBERI M, DI MARIO F, and TOMATI U. 2004.  **$\beta$ -Glucan synthase induction in mushrooms grown on olive mill wastewaters.** *Appl Microbiol Biotechnol.*, 66: 217–225. DOI 10.1007/s00253-004-1662-y.

RINALDI L, RIOUX L.E, BRITTEN M, TURGEON S.L. 2015. ***In vitro* bioaccessibility of peptides and amino acids from yogurt made with starch, pectin, or  $\beta$ -glucan.** *Int. Dairy J.* 46, 39–45.

ROMANO P, CAPECE A, JESPERSEN L. 2006. **Taxonomic and Ecological Diversity of Food and Beverage Yeasts.** Chapter 2. *The Yeast Handbook*. Amparo Querol, Graham H. Fleet (Eds.): Yeasts in Food and Beverages. © Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

SALVADOR C, LI B, HANSEN R, CRAMER D.E, KONG M, and JUN Y. 2008. **Yeast-derived  $\beta$ -glucan augments the therapeutic efficacy mediated by anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody in human carcinoma xenograft models.** *Clinical Cancer Research*, 14, 1239–1247.

SAMUELSEN A.B, SCHREZENMEIR J, and KNUTSEN S.H. 2014. **Effects of orally administered yeast-derived beta-glucans: a review.** *Molecular Nutrition & Food Research*, 58, 183-193.

SHARMA N.K, BENIWAL V, KUMAR N, KUMAR S, PATHERA A.K, and RAY A. 2014. **Production of tannase under solid-state fermentation and its application in detannification of guava juice.** *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 4(3), 281-290.

SMITH A.E, ZHANG Z, THOMAS C.R, MOXHAM K.E, and MIDDELBERG A.P. 2000. **The mechanical properties of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 97, 9871-9874.

SMITS G.J, KAPTEYN J.C, VAN DEN ENDE H, and KLIS F.M. 1999. **Cell wall dynamics in yeast.** *Current Opinion in Microbiology*, 2(4), 348–352.

SUPHANTHARIKA M, KHUNRAE P, THANARDKIT P, and VERDUYN C. 2003. **Preparation of spent brewer's yeast  $\beta$ -glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*.** *Bioresource Technology*, 88(1), 55–60.

VACHARAPRECHAKUL V, KRISDAPHONG P, and KANLAYAVATTANAKUL M. 2007. **The development and clinical evaluation of carboxymethyl glucan. M. Sc. (Cosmetic Science) Independence Study.** Chiang Rai: Mae Fah Luang University.

WALKER G.M. 2000. **Yeast physiology and biotechnology.** Wiley, Chichester.

ZHU F, DU B, and XU B. 2015. **A critical review on production and industrial applications of beta-glucans.** *Food Hydrocolloids*, 52, 275-288.

ŻYMAŃCZYK-DUDA E, BRZEZIŃSKA-RODAK M, KLIMEK-OCHAB M, DUDA M, and ZERKA A. 2017. **Yeast as a Versatile Tool in Biotechnology.** DOI: 10.5772/intechopen.70130.

# CAPÍTULO 15

## REMOÇÃO DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO EMPREGANDO BIOFILME MICROBIANO DESENVOLVIDO NATURALMENTE EM AREIA DE FILTROS DE ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ÁGUA – UM ESTUDO COMPARATIVO COM DIFERENTES SUPORTES

Data de aceite: 01/10/2020

Data de submissão: 18/09/2020

### Lúcia Allebrandt da Silva Ries

Universidade Estadual do Rio Grande do Sul –  
Unidade Porto Alegre  
Porto Alegre - RS – Brasil  
<http://lattes.cnpq.br/0862172420046110>  
ORCID: 0000-0002-1586-0041

### Karla Joseane Perez

Universidade Estadual do Rio Grande do Sul –  
Unidade Porto Alegre  
Porto Alegre - RS – Brasil  
<http://lattes.cnpq.br/6569533336260980>  
ORCID: 0000-0003-2601-8068

### Fernanda Cortez Lopes

Universidade Federal do Rio Grande do Sul –  
Centro de Biotecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Celular e Molecular  
Porto Alegre - RS – Brasil  
<http://lattes.cnpq.br/5857004786273929>  
ORCID: 0000-0003-1718-3467

### Paula Silva Pereira

Universidade Estadual do Rio Grande do Sul –  
Unidade Porto Alegre  
Porto Alegre - RS – Brasil  
<http://lattes.cnpq.br/3209092114489253>  
ORCID: 0000-0002-1716-7152

**RESUMO:** O presente trabalho apresentou três objetivos. O primeiro objetivo foi avaliar a remoção do ácido acetilsalicílico (AAS) por biodegradação,

empregando biofilme desenvolvido naturalmente na areia dos filtros de uma estação de tratamento de água (ETA). O segundo, foi avaliar a influência da natureza do suporte no processo de remoção do fármaco, empregando diferentes suportes (carvão ativado granular, esponja de poliuretano e areia dos filtros). O terceiro objetivo foi identificar a comunidade microbiana cultivável presente na areia dos filtros. A remoção do AAS a partir de soluções diluídas foi avaliada através de medidas espectroscópicas na região do ultravioleta. Para a identificação dos microorganismos foram realizadas diluições seriadas de uma suspensão do consórcio microbiano extraído da areia dos filtros. Foram encontradas  $2,1 \times 10^9$  UFC/g e as características morfo-tintoriais identificaram 1 isolado de fungo filamentosos e 24 isolados de bactérias: 41,66 % Gram-negativas e 58,33 % Gram-positivas. Análises para identificação molecular dos isolados foram realizadas através do sequenciamento parcial do gene de rRNA 16S, que identificou 15 isolados, estes pertencendo aos gêneros *Bordetella*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Kerstersia*, *Proteus* e *Alcaligenes*. A composição dos biofilmes foi avaliada, também, por microscopia eletrônica de varredura, que revelou um arranjo complexo composto por diversos morfotipos microbianos. Os ensaios de remoção mostraram que o AAS é predominantemente removido por adsorção em carvão ativado granular, e por biodegradação quando areia é empregada como suporte, ambos apresentando uma remoção superior a 90%. Dessa forma, conclui-se que a natureza do suporte é um importante parâmetro no processo de remoção do AAS, e que biofilmes microbianos

podem constituir uma excelente alternativa para tratamento de águas, contribuindo na redução dos custos nas ETAs e no prolongamento da vida útil dos filtros.

**PALAVRAS - CHAVE:** biodegradação, adsorção, *biofilme*, ácido acetilsalicílico, *diversidade microbiana*.

## REMOVAL OF ACETYLSALICYLIC ACID USING NATURALLY DEVELOPED MICROBIAL BIOFILM IN THE SAND OF FILTERS OF WATER TREATMENT PLANTS - A COMPARATIVE STUDY WITH DIFFERENT SUPPORTS

**ABSTRACT:** The present work presented three objectives. The first objective was to evaluate the removal of acetylsalicylic acid (ASA) by biodegradation, using biofilm naturally developed in the sand of the filters of a water treatment plant (WTP). The second was to evaluate the influence of the nature of the support on the pharmaceutical compound removal process, using different supports (granular activated carbon, polyurethane foam and water filter sand). The third objective was to identify the cultivable microbial community present in the water filter sand. Removal of the ASA from diluted solutions was evaluated using spectroscopic measurements in the ultraviolet region. To identify the microorganisms, serial dilutions of a suspension of the microbial consortium extracted from the water filter sand were performed. It was found  $2.1 \times 10^9$  CFU/g and the morpho-staining characteristics identified 1 filamentous fungus isolate and 24 bacterial isolates: 41.66% Gram-negative and 58.33% Gram-positive. Analyzes for molecular identification of the isolates were performed through partial sequencing of the 16S rRNA gene, that identified 15 isolates, these belonging to the genera *Bordetella*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Kerstersia*, *Proteus* and *Alcaligenes*. The composition of biofilms was also evaluated by scanning electron microscopy, which revealed a complex arrangement composed of several microbial morphotypes. The removal assays showed that the ASA is predominantly removed by adsorption on granular activated carbon, and by biodegradation when water filter sand is used as a support, both with a removal higher than 90%. Thus, it is concluded that the nature of the support is an important parameter in the process of removing ASA, and that microbial biofilms can be an excellent alternative for water treatment, contributing to reducing costs in WTPs and extending the useful life of filters.

**KEYWORDS:** biodegradation, adsorption, biofilm, acetylsalicylic acid, microbial diversity.

## 1 | INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, uma crescente atenção vem sendo dada à presença de fármacos no meio aquático, tendo em vista o reconhecimento de inúmeros efeitos danosos que podem causar aos ecossistemas ambientais e à saúde humana e animal, tais como toxicidade aquática, genotoxicidade, desenvolvimento de resistência em bactérias patogênicas, distúrbios endócrinos, imunodeficiências, carcinogênese e mutagênese (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006).

Usados como medicamentos por humanos e animais, estes compostos não são completamente metabolizados, sendo excretados pela urina ou fezes e, juntamente com seus produtos de degradação, entram nas águas residuais continuamente como substâncias

biologicamente ativas. Além disso, os processos de manufatura dos mesmos, bem como o descarte inadequado de medicamentos não utilizados ou vencidos são outras duas formas de liberação dos mesmos para o meio ambiente (HEBERER; REDDERSEN; MECHLINSKI, 2002; MOMPELAT; LE BOT; THOMAS, 2009).

As tecnologias empregadas em estações de tratamento de esgoto e de tratamento de água são ineficientes na remoção total destes compostos, fazendo com que sejam liberados na água de abastecimento, tornando-os em um potencial risco à saúde humana (H. JONES; VOULVOULIS; LESTER, 2005). A presença de compostos farmacêuticos no meio ambiente é ainda mais preocupante, considerando que os mesmos não aparecem individualmente, mas como uma mistura complexa, podendo levar a efeitos sinérgicos indesejados. Além disso, uma vez liberados no meio ambiente, estão sujeitos a diferentes processos de biodegradação e degradação fotoquímica, podendo produzir compostos de maior toxicidade e longa persistência no meio (LA FARRE et al., 2008).

Por serem bioacumulativos, apresentarem elevada persistência no meio ambiente, relativa solubilidade em águas e baixa biodegradabilidade, sua presença em águas residuárias e superficiais, sedimentos, solos, lençóis freáticos e até mesmo na água potável, constitui um desafio global às companhias de saneamento de água e esgoto. Atualmente, avaliações criteriosas vêm sendo conduzidas em todos os países no sentido de estabelecer níveis seguros de concentração máxima na água potável, assim como metodologias analíticas eficientes para sua detecção, e diretrizes e normas regulamentadoras para seu monitoramento (PETRIE; BARDEN; KASPRZYK-HORDERN, 2015).

As quantidades de compostos farmacêuticos encontradas em águas superficiais e potável costumam ser muito baixas, sendo frequentemente detectados em concentrações de  $\mu\text{g/L}$  -  $\text{ng/L}$  (HUERTA-FONTELA; GALCERAN; VENTURA, 2011). No entanto, em função de suas propriedades recalcitrantes e da contínua liberação para o meio ambiente, acabam se tornando um risco potencial para organismos aquáticos e terrestres, inclusive seres humanos. De posse deste conhecimento, a comunidade científica mundial vem nos últimos anos direcionando seus estudos para o desenvolvimento e aprimoramento de novas tecnologias de remoção destes poluentes, denominados poluentes emergentes ou contaminantes emergentes (BORGES et al., 2016; ISMAIL et al., 2017; KUMAR; CHOPRA, 2018; LIU et al., 2020; PANIGRAHY et al., 2020; SOUZA et al., 2018; TIWARI et al., 2017; VONA et al., 2015; ZHI et al., 2019).

Um poluente bastante comum encontrado em águas residuais é o ácido acetilsalicílico (AAS) ou ácido 2-acetoxibenzóico, amplamente consumido pela população como anti-inflamatório não esteroide, analgésico, antipirético e anticoagulante, normalmente utilizado sem prescrição médica (ZIYLAN; INCE, 2011).

Entre as várias tecnologias empregadas para remoção desse poluente emergente (tais como processos oxidativos avançados, fotocatalise, fotobiorremediação, sistema microalgal-bacteriano, ultramicofiltração, biorreatores e adsorção), a biofiltração surge

como uma opção eficiente, ambientalmente segura e economicamente viável. Biofiltros são formados pelo desenvolvimento de um biofilme microbiano na superfície de um suporte, em decorrência da disponibilidade de matéria orgânica biodegradável no meio (SIMPSON, 2008). A principal característica desse sistema está relacionada com a biodegradação de moléculas de compostos orgânicos dissolvidos, como consequência da atividade da comunidade microbiana. Dependendo da natureza do suporte, os poluentes orgânicos também podem ser removidos por adsorção, principalmente na fase inicial do processo de tratamento e, desse modo, além da biodegradação, a adsorção também contribui para a remoção de compostos poluentes (JIMÉNEZ; ARRIAGA; AIZPURI, 2016).

Um biofilme estruturado apresenta uma população mista de organismos como bactérias, fungos e protozoários. As bactérias saprofíticas normalmente possuem vantagem sobre as patogênicas, em ambientes com baixa concentração de nutrientes, como o encontrado em água para consumo humano. No tratamento biológico de água para consumo humano, o objetivo é manter uma população microbiana benigna, capaz de degradar a matéria orgânica e os compostos poluentes (WESTPHALEN; CORÇÃO; BENETTI, 2016).

Algumas vantagens que a biofiltração apresenta são: i) construção e operação mais simples; ii) oferece um aumento na vida útil dos filtros; iii) de custo relativamente baixo; iv) opera à temperatura ambiente; v) eficaz em baixas concentrações e altas taxas de fluxo; vi) alta eficiência de remoção, e vii) não emprega produtos químicos e não produz resíduos potencialmente perigosos ao meio ambiente (MOHAMED et al., 2016).

Muitas pesquisas vêm sendo realizadas com o propósito de melhorar o desempenho do processo de biodegradação, avaliando a influência de uma ampla variedade de condições, tais como o tempo de retenção nos filtros; a combinação de diferentes tecnologias; pH e composição do meio; possibilidade de interação entre os fármacos; a natureza do suporte e a composição dos micro-organismos envolvidos, seja isoladamente ou em comunidade mista (CHENG et al., 2017; LAI et al., 2020; LIU et al., 2020; PADHI; GOKHALE, 2017).

Considerando esses aspectos, o presente estudo apresentou três objetivos:

- I. avaliar a remoção do AAS por biodegradação, em sistema descontínuo, empregando biofilme microbiano desenvolvido naturalmente na areia dos filtros da ETA;
- II. avaliar a influência da natureza do suporte no processo de remoção do AAS, empregando diferentes suportes com e sem biofilme microbiano;
- III. identificar a comunidade microbiana presente na areia dos filtros da ETA, responsável pela biodegradação do AAS, utilizando sequenciamento parcial do gene de rRNA 16S.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Isolamento Dos Micro-Organismos

Os micro-organismos empregados neste estudo foram provenientes de um consórcio microbiano desenvolvido na superfície da areia bruta de filtros da estação de tratamento de água (ETA) - COMUSA Serviços de Água de Esgoto de Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul, selecionados por constituírem um biofilme crescido naturalmente sobre os grãos de areia.

O isolamento dos micro-organismos foi realizado através da inoculação de 10% (m/v) da areia oriunda dos filtros da ETA em água destilada esterilizada, submetida a um banho de ultrassom, por 10 min, para a liberação do consórcio microbiano da superfície dos grãos de areia.

### 2.2 Preparação do Inóculo do Consórcio Microbiano

Inicialmente, realizou-se a preparação do pré-inóculo, onde 1% da suspensão contendo o consórcio microbiano foi inoculado em 150 mL de meio TSB (*Tripton Soya Broth*). Esta solução foi incubada por 4 dias a 35 °C, em estufa microbiológica. Após esse período, uma alíquota de 1% (v/v) do pré-inóculo foi transferida para frasco erlenmeyer contendo caldo TSB, e incubou-se por mais 7 dias em agitador orbital (125 rpm) a 35 °C, constituindo assim o inóculo.

### 2.3 Caracterização Morfo-Tintorial das Colônias Isoladas do Biofilme Desenvolvido Naturalmente na Areia dos Filtros da Eta

Transferiu-se 1 mL do inóculo homogeneizado para um tubo contendo 9 mL de solução NaCl 0,9% e, assim sucessivamente, realizando-se diluições decimais da suspensão. Após, um volume de 1 mL de cada amostra, nas diluições realizadas, foi plaqueado através da técnica de *Pour Plate* em ágar BHI (*Brain Heart Infusion*), e realizou-se a incubação das placas em estufa (36 ± 1 °C) por até 48 h. Após, realizou-se a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL), e o isolamento das colônias através das características morfológicas. Para cada colônia isolada, foram observadas as características morfológicas (coloração, tamanho e tipo de borda das colônias) e coloração diferencial de Gram. Os experimentos foram realizados em duplicata.

### 2.4 Caracterização da Composição do Consórcio Microbiano: Extração do dna Genômico das Bactérias e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os micro-organismos isolados (conforme descrito em 2.1) foram estocados em ágar BHI inclinado a 4 °C. Cada micro-organismo foi inoculado em 5 mL de caldo LB, *overnight* a 37 °C e 150 rpm. O cultivo foi centrifugado por 10 min a 6.000 x g, e logo após retirou-se o sobrenadante. Suspendeu-se o *pellet* em 0,5 mL de tampão SET (NaCl 5 M, EDTA 0,5 M, Tris-HCl 1 M pH 7,5), centrifugado por 5 min a 9.500 x g, e retirou-se o sobrenadante. Nessa etapa, acrescentou-se ao *pellet* 4 µL de lisozima e 1 mL do tampão SET, incubando por 45



min à temperatura ambiente. Adicionou-se 1/10 do volume de SDS 10% e 1/3 de volume de NaCl 5M e 1/1 de clorofórmio, incubando por 10 min. Após incubação, foi centrifugado por 10 min a 1920  $x g$ . Transferiu-se a fase aquosa para outro tubo. Para a precipitação do DNA, utilizou-se 1:1 de isopropanol previamente gelado, centrifugando por 10 min a 16060  $x g$ . Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de etanol 70% e foi centrifugado por 5 min a 16060  $x g$ . Adicionou-se em 30  $\mu L$  de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 e EDTA 1 mM, pH 8,0) com 20  $\mu g/mL$  de RNase, que foi incubada por 1 hora a 37 °C. Após as amostras foram quantificadas em NanoDrop®, e em seguida, foram aplicadas em gel de agarose 0,9 % para visualização do DNA genômico.

Os ensaios de PCR foram realizados com os *primers* universais 27f (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1525r (5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'). As amostras foram sequenciadas pela empresa ACTGene. O algoritmo BLAST foi utilizado para busca por seqüências homólogas e, para alinhamento destas seqüências, utilizou-se o software BioEdit. As seqüências editadas foram depositadas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e os números de acesso podem ser encontrados na Tabela 1.

## 2.5 Desenvolvimento do Biofilme Microbiano nos Diferentes Suportes

Os seguintes suportes foram utilizados:

- Esponja de poliuretano (cortada em cubos de 1 cm de aresta), designada por PU;
- Carvão ativado granular (com tamanho de grão igual a 3,13 mm, área superficial igual a 658  $m^2.g^{-1}$  e volume de poro igual a 0,0286  $cm^3.g^{-1}$ ), designado por CAG+;
- Carvão ativado granular (com tamanho de grão igual a 1,11 mm, área superficial igual a 860  $m^2.g^{-1}$  e volume de poro igual a 0,212  $cm^3.g^{-1}$ ), designado por CAG-;
- Areia bruta (oriunda da ETA com o biofilme naturalmente desenvolvido na superfície dos grãos), designada por AB;
- Areia lavada (com o biofilme removido conforme descrito em 2.1), designada por AL.

Após esterilização (121 °C/15 min), 1,0 g de cada suporte foi transferido para erlenmeyers contendo 150 mL do meio de cultivo TSB. Na seqüência, procedeu-se à inoculação com 1% do inóculo previamente preparado (conforme descrito em 2.2). Os sistemas foram dispostos em incubadora shaker a 35 °C, por 10 dias, sob 80 rpm de agitação orbital. Após, realizou-se filtração a vácuo, e lavagem dos sistemas biofilmes/suportes com solução salina (NaCl 0,9%) para remoção do meio de cultivo. O procedimento foi realizado em triplicata.

## 2.6 Avaliação da Remoção do AAS

Os experimentos foram realizados em sistema descontínuo (sistema *batch*) com o objetivo de avaliar a capacidade de remoção do AAS através de dois processos distintos: biodegradação e adsorção.

Para análise da concentração do AAS (inicial e residual) empregou-se a técnica da espectrofotometria na região do ultravioleta. Utilizou-se um espectrofotômetro UV/Vis Perkin-Elmer, modelo LAMBDA 265 e uma cubeta de quartzo. As medidas foram realizadas no comprimento de onda de 229 nm, previamente determinado como o comprimento de onda de maior absorbância do fármaco.

O AAS utilizado foi adquirido da Sigma-Aldrich, com 99,0% de pureza. Os ensaios foram realizados empregando água destilada esterilizada (121 °C/15 min), que posteriormente recebeu a adição do AAS na concentração de 50 mg.L<sup>-1</sup>, valor que reproduz a concentração encontrada em águas superficiais (GARZA-CAMPOS et al., 2016).

Os ensaios de biodegradação seguiram o seguinte protocolo: os sistemas biofilme/suporte foram transferidos para erlenmeyers contendo 250 mL de solução de AAS 50 mg.L<sup>-1</sup>, sendo posteriormente dispostos em incubadora shaker a 30 °C, sob agitação orbital de 120 rpm. Alíquotas foram retiradas periodicamente para mensuração da concentração residual do fármaco, até uma condição de equilíbrio ser atingida em cada sistema. Para eliminação da interferência de compostos orgânicos remanescentes do meio de cultivo nas leituras de absorbância, as alíquotas foram retiradas mediante filtros de membranas (porosidade de 0,22 µm) acoplados às seringas de coleta.

Os ensaios de adsorção seguiram protocolo similar aos ensaios de biodegradação, transferindo-se 1,0 g de cada suporte (sem biofilme) para erlenmeyers contendo 250 mL de solução de AAS 50mg.L<sup>-1</sup>.

Todos os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados expressos representam as médias obtidas.

## 2.7 Caracterização Morfológica dos Micro-Organismos Desenvolvidos nos Diferentes Substratos

O biofilme desenvolvido naturalmente na superfície da areia dos filtros e os biofilmes crescidos laboratorialmente na superfície dos diferentes suportes foram caracterizados morfolologicamente através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para tal, as amostras foram preparadas conforme o protocolo de amostras biológicas para MEV do Centro de Microscopia e Microanálise (CMM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). As microscopias foram realizadas empregando o microscópio Jeol JSM 6060.

## 3 I RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Caracterização Morfo-Tintorial das Colônias Isoladas do Biofilme Desenvolvido Naturalmente na Areia dos Filtros Da ETA

Após o plaqueamento e incubação, realizou-se a contagem das UFCs, sendo encontradas  $2,1 \times 10^9$  UFC/g. Através das características morfológicas e tintoriais das colônias, foram identificados 1 isolado de fungo filamentososo e 24 isolados de bactérias, sendo 41,66 % Gram-negativas e 58,33 % Gram-positivas.

### 3.2 Identificação Molecular dos Isolados Bacterianos Encontrados no Biofilme Desenvolvido Naturalmente na Areia dos Filtros da ETA

As análises para identificação molecular dos isolados, através de sequenciamento parcial do gene rRNA 16S, apresentaram identidade com os micro-organismos representados na Tabela 1.

Isolado	Identificação	Identidade	Código de Acesso
1a	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	98.89%	MT994287
1b	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	88.25%	MT994326
2a	<i>Kerstersia gyiorum</i>	99.59%	MT980912
2b	<i>Proteus mirabilis</i>	99.59%	MT980914
2d	<i>Alcaligenes faecalis</i>	99.86%	MT994550
3	<i>Kerstersia gyiorum</i>	99.73%	MT994666
4a	<i>Proteus mirabilis.</i>	99.73%	MT994676
4b	<i>Bordetella sp.</i>	99.44%	MT994649
5a	<i>Bacillus safensis</i>	99.17%	MT994684
6	<i>Bacillus safensis</i>	97.61%	MT994685
7	<i>Bacillus pumilus</i>	99.44%	MT994710
8b	<i>Proteus mirabilis</i>	99.87%	MT994664
9c	<i>Bacillus stratosphericus</i>	85.09%	MT994697
11	<i>Bacillus pumilus</i>	99.30%	MT994698
12	<i>Bacillus pumilus</i>	98.75%	MT994791

Tabela 1 - Identificação molecular dos isolados bacterianos encontrados no biofilme desenvolvido naturalmente na areia dos filtros da ETA.

Fonte: Autores (2020).

Os micro-organismos isolados foram dos gêneros *Bacillus*, *Bordetella*, *Proteus*, *Kerstesia*, *Alcaligenes* e *Pseudomonas*. Alguns dos isolados representam a mesma linhagem, e por isso foram omitidos na tabela.

Conforme mostra a Tabela 1, foi possível identificar diversos isolados do gênero *Bacillus*, sendo estes pertencentes às espécies *B. zhangzhouensis*, *B. stratosphericus*, *B. pumilus* e *B. safensis*. Esse gênero é composto por micro-organismos considerados ubíquos, podendo ser isolados de diferentes fontes (solo, água doce, água salgada e alimentos). Sabe-se que algumas espécies do gênero *Bacillus* apresentam elevada capacidade de fixação em superfícies, em função de apresentarem estruturas do tipo filamentosas, que favorecem à adesão destes micro-organismos em suportes sólidos (HUSMARK; RONNER, 1990).

Em um estudo sobre o uso de filtros de carvão ativado granular associado a micro-organismos, para remoção de fármacos no tratamento de água de abastecimento foram isolados 31 amostras de micro-organismos, sendo essas representadas em sua totalidade por colônias bacterianas integrantes dos filos Firmicutes e Proteobacteria (BORGES et al., 2016). Por meio das sequências do gene 16S rRNA amplificadas a partir do DNA das amostras isoladas, os autores identificaram um total de seis gêneros: *Bacillus*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Pseudomonas*, *Shinella* e *Sphingomonas*, com dominância de bactérias do gênero *Bacillus* (BORGES et al., 2016).

Linhagens de *Bacillus pumilus*, identificadas no presente estudo, também foram isoladas de amostras de solo contaminado com petróleo bruto na Índia, sendo verificada sua participação na biodegradação do pireno, um hidrocarboneto aromático policíclico. (KHANNA; GOYAL; KHANNA, 2011). Outra cepa bacteriana nativa, eficiente na biodegradação de hidrocarbonetos é a denominada *Bacillus pumilus* KS2, isolada de solo contaminado com óleo cru coletado de campos de petróleo, e que também apresenta atividade biossurfactante (PATOWARY et al., 2015).

*Bacillus zhangzhouensis*, outra espécie identificada na areia dos filtros da ETA, foi isolado pela primeira vez a partir da água de cultivo de camarão, em Zhangzhou, na China, sendo por isto denominado Zhangzhouensis. As células são Gram-positivas, estritamente aeróbicas, em forma de bastonete, apresentando 0,5–0,6 mm de largura e 1,8–2,0 mm de comprimento, apresentando mobilidade devido à existência de flagelos subpolares. (LIU et al., 2016).

Bactérias do gênero *Bordetella*, também foram identificadas na areia dos filtros da ETA. Estas bactérias são frequentemente encontradas no solo, água, sedimentos e plantas (HAMIDOU SOUMANA; LINZ; HARVILL, 2017). Nisola e colaboradores isolaram *Bordetella* sp. Sulf-8 do lodo ativado aeróbio de uma estação de tratamento de água em Yongin, na Coreia, e aplicaram, de forma eficaz, na remoção de sulfeto de hidrogênio, um gás tóxico gerado em diversos tipos de indústrias (NISOLA et al., 2010). A similaridade dos locais de isolamento sugere que estações de tratamento de água representam um habitat comum

entre as diferentes linhagens destas bactérias. De acordo com Hamidou e colaboradores, outras linhagens de *Bordetella* isoladas de solo também apresentaram capacidade para degradação de uma grande variedade de compostos orgânicos, demonstrando potencial em processos de biodegradação (HAMIDOU SOUMANA; LINZ; HARVILL, 2017).

Bactérias do gênero *Proteus*, identificadas na areia dos filtros, tem sua presença largamente documentada em solos e águas (DRZEWIECKA, 2016). GE e colaboradores isolaram uma linhagem da água do mar contaminada com efluente industrial, na qual foi avaliada sua habilidade de redução do cromo hexavalente, em condições de crescimento e não crescimento bacteriano. Em condição de crescimento, a capacidade de redução foi de 1000 mg.L<sup>-1</sup>, em 144 h, no meio LB. Diferentemente, em repouso, as bactérias puderam reduzir 200 mg.L<sup>-1</sup> de Cr(VI), em apenas 24 h, na presença de tampão Tris-HCl (GE et al., 2013). Uma linhagem de *Proteus mirabilis* foi isolada de um aterro sanitário na Nigéria, e sua capacidade de descolorir e biodegradar o corante azo azul reativo 13 foi avaliada, sendo demonstrada sua utilidade em tratamentos de efluentes sem dano socioambiental (OLUKANNI et al., 2010).

O gênero *Kerstersia* (homenagem a K. Kersters, um eminente microbiologista belga), identificado na areia dos filtros da ETA, é descrito na literatura como cocos Gram-negativos, pequenos (1–2 µm de comprimento), podendo ocorrer em unidades, em pares ou em cadeias curtas. Cepas desse gênero foram isoladas de várias amostras clínicas humanas, sendo a *Kerstersia gyiorum* a espécie típica (COENYE et al., 2003).

Referente às bactérias do gênero *Pseudomonas*, também identificadas na areia dos filtros, estudos revelam sua atuação na degradação de diferentes compostos orgânicos. Apresentam uma distribuição cosmopolita, podendo ser encontradas em águas e solo, possuindo uma baixa exigência nutricional. Somam-se a estas propriedades a capacidade de formar biofilmes e a alta resistência apresentada (SANTOS; COLOMBO, 2015).

Bactérias do gênero *Alcaligenes*, identificadas na areia dos filtros da ETA, apresentam uma ampla distribuição em solo e águas. Estudo recente com a espécie *Alcaligenes faecalis* (BHARALI et al., 2011) isolada de amostra de solo contaminado com petróleo demonstrou sua habilidade em produzir biosurfactante com ampla aplicação biotecnológica e industrial para degradação de hidrocarbonetos.

Pode-se constatar que a maioria das bactérias identificadas, no presente estudo, é comumente isolada de amostras de solos e águas, muitas vezes contaminadas, também apresentando características de biodegradação de vários compostos orgânicos. Assim, a atividade de biodegradação apresentada pelo consórcio microbiano isolado em relação a outros poluentes emergentes demonstra ser uma área de estudo bastante promissora. Ressalta-se que a identificação do fungo filamentosos isolado será realizada em trabalhos futuros.

### 3.3 Avaliação da Remoção do AAS

A Figura 1 exibe a curva cinética de remoção do AAS por adsorção nos diferentes suportes estudados. É possível observar uma redução na concentração ao longo do tempo para todos os suportes, com destaque para o desempenho apresentado pelas amostras de carvão ativado granular. Ambas apresentaram elevada eficiência de remoção, sendo que o CGA- apresentou um decaimento inicial na concentração do AAS mais pronunciado. A porcentagem média de remoção, após 24 h, para o CAG- foi de 99,21% enquanto que para o CAG+ foi de 72,12%.

A areia lavada e a esponja de poliuretano, por outro lado, apresentaram taxas de remoção bastante lentas, com cerca de 15,38% e 29,97%, respectivamente, ao final de 24 h.

Ao final de 7 dias, as eficiências de remoção foram 98,20; 94,60; 91,63 e 86,87% para CGA-, CGA+, AL e PU, respectivamente. A maior taxa de remoção sendo alcançada pelo CAG-. A maior capacidade de remoção exibida por este suporte pode ser explicada em virtude de sua maior área superficial e maior volume de poro (conforme descrito em 2.5), uma vez que a capacidade adsorptiva está diretamente relacionada à área superficial do adsorvente e ao volume de poro. Quanto maior a área superficial, maior a probabilidade de interações do adsorbato com a superfície do adsorvente, enquanto que poros maiores conseguem acomodar um maior número de moléculas. Outro fator a ser levado em consideração é a presença de grupos funcionais orgânicos (ácidos ou básicos) na superfície de adsorventes carbonáceos. Conforme relatado na literatura (ARAMPATZIDOU; VOUTSA; DELIYANNI, 2018), as propriedades adsorptivas de um material dependem tanto da estrutura porosa quanto dos grupos químicos presentes em sua superfície. Dessa forma, a elevada eficiência na remoção do AAS apresentada pelas duas amostras de carvão ativado pode ser atribuída, também, à presença de grupos funcionais superficiais, que atuam como sítios adsorptivos.

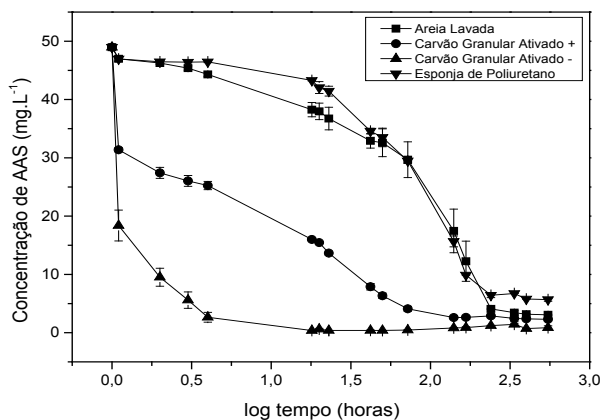


Figura 1 – Remoção do AAS por adsorção empregando diferentes suportes com biofilme microbiano.

Fonte: Autores (2020).

A Figura 2 exibe a curva cinética de remoção do AAS por biodegradação para os diferentes sistemas estudados. É possível observar uma redução na concentração do fármaco ao longo do tempo para os sistemas constituídos pelos suportes AB, AL, PU e CGA+, com destaque para o desempenho apresentado pelos sistemas biofilme natural/AB e biofilme cultivado/AL. O sistema biofilme natural/AB (constituído pelo biofilme naturalmente desenvolvido nos filtros da ETA) apresentou remoção de 57,20%, enquanto que o sistema biofilme cultivado/AL (constituído pelo biofilme desenvolvido laboratorialmente a partir da suspensão microbiana oriunda dos filtros da ETA) apresentou remoção de 46,88%, após 24 h.

Pode-se observar também que os sistemas biofilme cultivado/PU e biofilme cultivado/CGA+ apresentaram taxas de remoção comparativamente mais lentas, com eficiências, após 24 h, na ordem de 31,18% e 25,42%, respectivamente.

O sistema biofilme cultivado/CGA-, por outro lado, não conseguiu biodegradar o fármaco. Tal fato pode estar relacionado à própria estrutura do suporte (que apresenta elevada área superficial e porosidade), que favorece o acúmulo de compostos orgânicos e a formação de biofilme microbiano. O aumento da espessura do biofilme conduz à colmatação, limitando a difusão de nutrientes e de oxigênio à comunidade microbiana, acarretando a morte celular (LAZAROVA; MANEM, 1995). Sabe-se que a atividade de um biofilme se intensifica com sua espessura, até um nível crítico, geralmente situado entre 50 e 500  $\mu\text{m}$ , a partir do qual sua atividade decai. Por outro lado, um biofilme muito fino não é capaz de biodegradar compostos orgânicos (BRANDA et al. 2005).

Ao final de 7 dias, as eficiências de remoção foram 93,79; 90,16; 86,11; 73,33 e

0% para AB, AL, PU, CGA+ e CGA-, respectivamente. A maior taxa de remoção sendo alcançada pelo sistema constituído pelo biofilme natural/AB.

Comparando os dois processos de remoção do AAS, pode-se perceber que a adsorção é o que apresenta maior eficiência em um menor intervalo de tempo quando carvão ativado de elevada área superficial e porosidade é empregado como suporte. Apesar de ser menos eficiente, a biodegradação apresenta a grande vantagem de atuar na decomposição/metabolização da molécula conduzindo à sua mineralização.

Por outro lado, quando um biofilme microbiano é desenvolvido sobre uma superfície sólida, suportes com elevada área superficial e porosidade podem sofrer acolmatação, sendo preferível, neste caso, suportes mais rugosos e de menor área superficial e porosidade. Tanto para a adsorção quanto para a biodegradação, a natureza do suporte exerce grande influência no mecanismo seguido e na eficiência do processo.

O processo de remoção de um composto orgânico passa por uma transição entre a adsorção e a biodegradação, iniciando pela adsorção, seguindo-se pela combinação dos dois processos e finalizando com a predominância da biodegradação (WESPHALEN; CORÇÃO; BENETTI, 2016). A fase inicial do crescimento microbiano (fase *lag*) pode ser atribuída ao tempo requerido para a adaptação da comunidade microbiana ao suporte.

Apesar do grande número de pesquisas na área, são necessários mais estudos referentes à composição e à atividade de biofilmes microbianos desenvolvidos sobre diferentes suportes para um conhecimento mais profundo do processo de biodegradação, e para o desenvolvimento da tecnologia da biofiltração, visando sua aplicação em estações de tratamento de água.

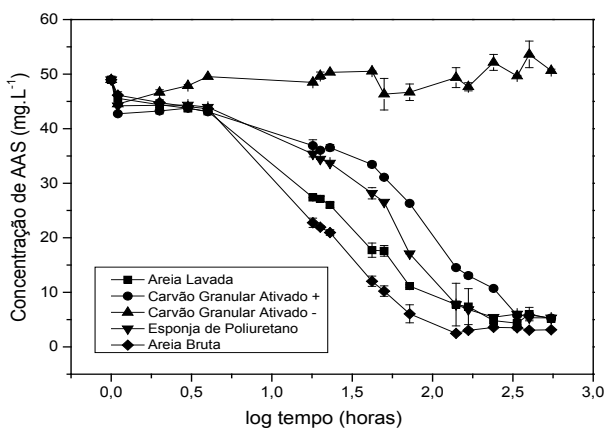


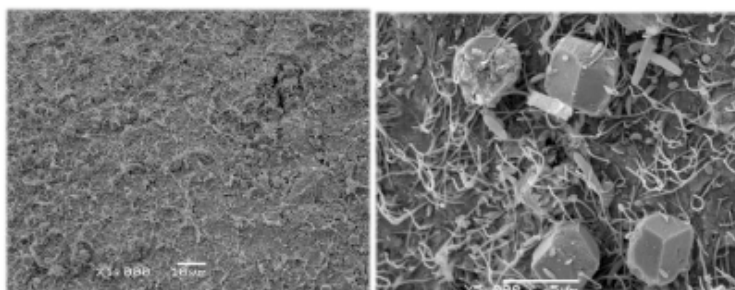
Figura 2 – Remoção do AAS por biodegradação empregando diferentes suportes com biofilme microbiano.

Fonte: Autores (2020).

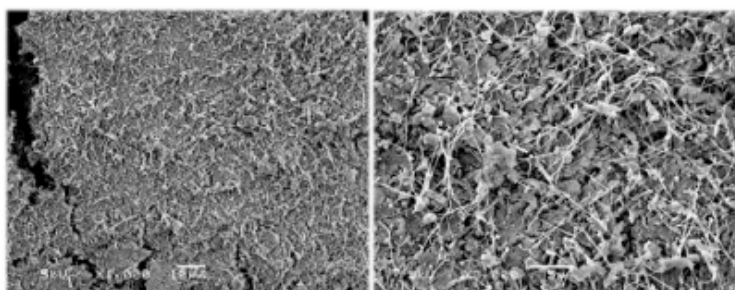


### 3.4 Caracterização Morfológica dos Micro-Organismos

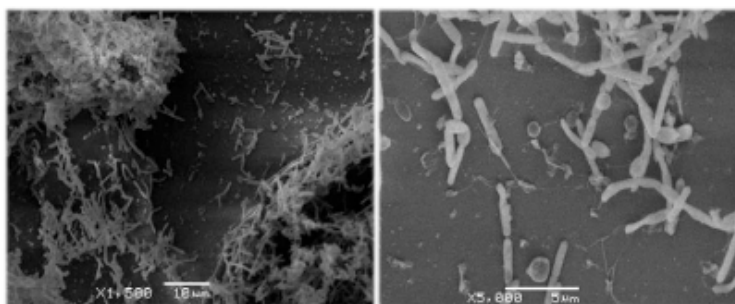
A Figura 3 apresenta as imagens de microscopia eletrônica de varredura obtidas para os diferentes sistemas estudados. As imagens revelam para todos os sistemas estudados a existência de um arranjo complexo composto por diversos morfotipos microbianos, com a fixação dos mesmos se dando preferencialmente nas irregularidades superficiais, poros e rugosidades.



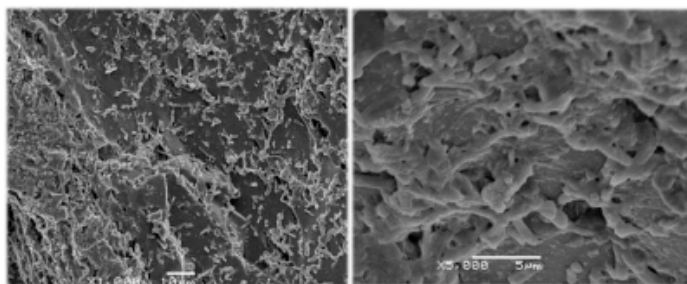
a)



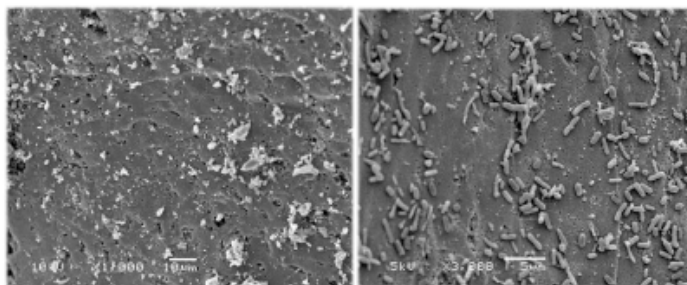
b)



c)



d)



e)

Figura 3 – Imagens de microscopias eletrônicas de varredura obtidas para os diferentes sistemas estudados. Biofilme desenvolvido naturalmente na areia dos filtros (a) e biofilmes desenvolvidos laboratorialmente na: areia lavada (b); esponja de poliuretano (c); carvão ativado granular de maior área superficial e porosidade (d) e carvão ativado granular de menor área superficial e porosidade (e).

Fonte: Autores (2020).

## 4 | CONCLUSÕES

A remoção do ácido acetilsalicílico empregando biofilme microbiano, desenvolvido naturalmente na areia dos filtros de uma estação de tratamento de água, a influência da natureza do suporte e a identificação da diversidade microbiana do biofilme foram avaliados neste estudo.

A partir das características morfo-tintoriais das colônias, identificou-se predominância de bactérias no consórcio microbiano, com 1 isolado de fungo filamentosos e 24 isolados de bactérias: 41,66 % Gram-negativas e 58,33 % Gram-positivas. A análise molecular, realizada através de sequenciamento parcial do gene de rRNA 16S, identificou 15 isolados, estes pertencendo aos gêneros *Bordetella*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Kerstersia*, *Proteus* e *Alcaligenes*.

A microscopia eletrônica de varredura revelou, para todos os sistemas, a existência de um arranjo complexo composto por diversos morfotipos microbianos, sendo visualizadas

várias bactérias com formatos bacilares, condizente com o encontrado na identificação molecular das espécies bacterianas.

Os ensaios de remoção mostraram que o AAS é predominantemente removido por adsorção quando carvão ativado granular é empregado como suporte e por biodegradação quando areia é empregada, ambos apresentando uma eficiência de remoção superior a 90%. O carvão ativado com biofilme não apresentou remoção do fármaco. Provavelmente, este comportamento se deve à saturação de seus poros, tanto pelas moléculas do fármaco (retidas por adsorção) quanto pelo próprio biofilme desenvolvido. Tal fato evidencia a importância das características físicas do suporte (como área superficial, rugosidade e porosidade) sobre os processos de adsorção/biodegradação.

Poucos trabalhos sobre a diversidade microbiana em biofilmes associados a filtros de ETAs são relatados na literatura. A identificação da composição da comunidade microbiana pode contribuir para o desenvolvimento da tecnologia de biofiltração, e sua aplicação na remoção de fármacos em estações de tratamento.

Dessa forma, conclui-se que a natureza do suporte é um importante parâmetro no processo de remoção e que biofilmes microbianos podem constituir uma excelente alternativa para tratamento de águas, contribuindo na redução dos custos nas ETAs e no prolongamento da vida útil dos filtros

## AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à COMUSA - Serviços de Água e Esgoto de Novo Hamburgo; ao Centro de Microscopia e Microanálise (CMM) da UFRGS; ao CNPq (bolsa de iniciação científica no ensino médio); ao INICIE/UERGS (bolsa de iniciação científica) e aos Técnicos Químicos Marcel Ludwig e Marcus Vinícius da Silva.

## REFERÊNCIAS

- ARAMPATZIDOU, Anastasia; VOUTSA, Dimitra; DELIYANNI, Eleni. Removal of bisphenol A by Fe-impregnated activated carbons. **Environmental Science and Pollution Research**, [S. l.], v. 25, n. 26, p. 25869–25879, 2018.
- BHARALI, P. *et al.* Crude biosurfactant from thermophilic *Alcaligenes faecalis*: feasibility in petro-spill bioremediation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [S. l.], v. 65, n. 5, p. 682–690, 2011.
- BORGES, Rivea Medri *et al.* Uso de filtros de carvão ativado granular associado a microrganismos para remoção de fármacos no tratamento de água de abastecimento. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 709–720, 2016.
- BRANDA, Steven S.; VIK, Åshild; FRIEDMAN, Lisa; KOLTER, Roberto. Biofilms: the matrix revisited. **Trends in microbiology**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 20–26, 2005.

- CHENG, Zhuowei *et al.* Improved biodegradation potential of chlorobenzene by a mixed fungal-bacterial consortium. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [S. l.], v. 123, p. 276–285, 2017.
- COENYE, Tom E. *et al.* *Kerstersia gyiorum* gen. nov., sp. nov., a novel *Alcaligenes faecalis*-like organism isolated from human clinical samples, and reclassification of *Alcaligenes denitrificans* Rüger and Tan 1983 as *Achromobacter denitrificans* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** (2003), 53, 1825–1831.
- DOS SANTOS, Glauca; COLOMBO, Tatiana Elias. Prevalência de *Pseudomonas aeruginosa* em águas e superfície. **J Health Sci Instit**, [S. l.], v. 33, n. 4, p. 314–318, 2015.
- DRZEWIECKA, Dominika. Significance and roles of *Proteus* spp. bacteria in natural environments. **Microbial ecology**, [S. l.], v. 72, n. 4, p. 741–758, 2016.
- FENT, Karl; WESTON, Anna A.; CAMINADA, Daniel. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic toxicology**, [S. l.], v. 76, n. 2, p. 122–159, 2006.
- GARZA-CAMPOS, Benjamin *et al.* Salicylic acid degradation by advanced oxidation processes. Coupling of solar photoelectro-Fenton and solar heterogeneous photocatalysis. **Journal of hazardous materials**, [S. l.], v. 319, p. 34–42, 2016.
- GE, Shimei *et al.* Comparative evaluations on bio-treatment of hexavalent chromate by resting cells of *Pseudochrobactrum* sp. and *Proteus* sp. in wastewater. **Journal of environmental management**, [S. l.], v. 126, p. 7–12, 2013.
- H. JONES, O. A.; VOULVOULIS, Nick; LESTER, John N. Human pharmaceuticals in wastewater treatment processes. **Critical reviews in environmental science and technology**, [S. l.], v. 35, n. 4, p. 401–427, 2005.
- HAMIDOU SOUMANA, Illiassou; LINZ, Bodo; HARVILL, Eric T. Environmental origin of the genus *Bordetella*. **Frontiers in microbiology**, [S. l.], v. 8, p. 28, 2017.
- HEBERER, Th; REDDERSEN, K.; MECHLINSKI, A. From municipal sewage to drinking water: fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment in urban areas. **Water Science and Technology**, [S. l.], v. 46, n. 3, p. 81–88, 2002.
- HUERTA-FONTELA, Maria; GALCERAN, Maria Teresa; VENTURA, Francesc. Occurrence and removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment. **Water research**, [S. l.], v. 45, n. 3, p. 1432–1442, 2011.
- HUSMARK, Ulrika; RÖNNER, Ulf. Forces involved in adhesion of *Bacillus cereus* spores to solid surfaces under different environmental conditions. **Journal of Applied Bacteriology**, [S. l.], v. 69, n. 4, p. 557–562, 1990.
- ISMAIL, Maha M. *et al.* Remediation of a mixture of analgesics in a stirred-tank photobioreactor using microalgal-bacterial consortium coupled with attempt to valorise the harvested biomass. **Bioresource technology**, [S. l.], v. 232, p. 364–371, 2017.

- JIMÉNEZ, Lucero; ARRIAGA, Sonia; AIZPURU, Aitor. Assessing biofiltration repeatability: statistical comparison of two identical toluene removal systems. **Environmental Technology**, [S. l.], v. 37, n. 6, p. 681–693, 2016.
- KHANNA, Purnima; GOYAL, Dinesh; KHANNA, Sunil. Pyrene Degradation by *Bacillus pumilus* Isolated from Crude Oil Contaminated Soil. **Journal Polycyclic Aromatic Compounds**, v. 31, 2011.
- KUMAR, Vinod; CHOPRA, A. K. Phytoremediation potential of water caltrop (*Trapa natans* L.) using municipal wastewater of the activated sludge process-based municipal wastewater treatment plant. **Environmental technology**, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 12–23, 2018.
- LA FARRE, Marinel *et al.* Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 27, n. 11, p. 991–1007, 2008.
- LAI, Changmiao *et al.* A novel integrated bio-reactor of moving bed and constructed wetland (MBCW) for domestic wastewater treatment and its microbial community diversity. **Environmental Technology**, [S. l.], p. 1–16, 2020.
- LAZAROVA, V.; MANEM, J. Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. **Water research**, [S. l.], v. 29, n. 10, p. 2227–2245, 1995.
- LIU, Yuxuan *et al.* Adsorption and removal of bisphenol A in two types of sediments and its relationships with bacterial community. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [S. l.], v. 153, p. 105021, 2020.
- LIU, Yang Qiliang; JUAN DU, Lai; SHAO, Zongze. *Bacillus zhangzhouensis* sp. nov. and *Bacillus australimaris* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, 1193–1199, 2016.
- MOHAMED, Elham F. *et al.* Biofiltration technology for the removal of toluene from polluted air using *Streptomyces griseus*. **Environmental technology**, [S. l.], v. 37, n. 10, p. 1197–1207, 2016.
- MOMPELAT, S.; LE BOT, B.; THOMAS, O. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. **Environment international**, [S. l.], v. 35, n. 5, p. 803–814, 2009.
- NISOLA, Grace M. *et al.* Hydrogen sulfide degradation characteristics of *Bordetella* sp. Sulf-8 in a biotrickling filter. **Bioprocess and biosystems engineering**, [S. l.], v. 33, n. 9, p. 1131–1138, 2010.
- OLUKANNI, O. D. *et al.* Decolorization and biodegradation of Reactive Blue 13 by *Proteus mirabilis* LAG. **Journal of Hazardous Materials**, [S. l.], v. 184, n. 1–3, p. 290–298, 2010.
- PADHI, Susant Kumar; GOKHALE, Sharad. Benzene biodegradation by indigenous mixed microbial culture: kinetic modeling and process optimization. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [S. l.], v. 119, p. 511–519, 2017.
- PANIGRAHY, Namita *et al.* Metabolic profile analysis and kinetics of p-cresol biodegradation by an indigenous *Pseudomonas citronellolis* NS1 isolated from coke oven wastewater. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [S. l.], v. 147, p. 104837, 2020.

PATOWARY, Kaustuvmani *et al.* Degradation of polyaromatic hydrocarbons employing biosurfactant-producing *Bacillus pumilus* KS2. **Annals of Microbiology**, v. 65, pages 225–234, 2015.

PETRIE, Bruce; BARDEN, Ruth; KASPRZYK-HORDERN, Barbara. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. **Water research**, [S. l.], v. 72, p. 3–27, 2015.

RAJAMANICKAM, Ravi *et al.* Batch biodegradation of toluene by mixed microbial consortia and its kinetics. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [S. l.], v. 119, p. 282–288, 2017.

SIMPSON, David R. Biofilm processes in biologically active carbon water purification. **Water research**, [S. l.], v. 42, n. 12, p. 2839–2848, 2008.

SOUZA, Fernanda Siqueira *et al.* Comparison of different advanced oxidation processes for the removal of amoxicillin in aqueous solution. **Environmental technology**, [S. l.], v. 39, n. 5, p. 549–557, 2018.

TIWARI, Bhagyashree *et al.* Review on fate and mechanism of removal of pharmaceutical pollutants from wastewater using biological approach. **Bioresource technology**, [S. l.], v. 224, p. 1–12, 2017.

VONA, Andrea *et al.* Comparison of different removal techniques for selected pharmaceuticals. **Journal of Water Process Engineering**, [S. l.], v. 5, p. 48–57, 2015.

WESTPHALEN, Ana Paula Campos; CORÇÃO, Gertrudes; BENETTI, Antônio Domingues. Utilização de carvão ativado biológico para o tratamento de água para consumo humano. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 425–436, 2016.

ZHI, Dan *et al.* Current progress in the adsorption, transport and biodegradation of antibiotics in soil. **Journal of environmental management**, [S. l.], v. 251, p. 109598, 2019.

ZIYLAN, Asu; INCE, Nilsun H. The occurrence and fate of anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in sewage and fresh water: treatability by conventional and non-conventional processes. **Journal of hazardous materials**, [S. l.], v. 187, n. 1–3, p. 24–36, 2011.

## TUBERCULOSE: ASPECTOS DA INFECÇÃO CAUSADA POR *MYCOBACTERIUM TUBERCULÓISIS* NA POPULAÇÃO DE SOBRAL, NO ESTADO DO CEARÁ NO PERÍODO DE 2012-2016

Data de aceite: 01/10/2020

Data de submissão: 06/10/2020

### Sabrina Fuziger Inácio Brandão

Centro Universitário INTA (UNINTA)  
Sobral – Ceará  
<http://lattes.cnpq.br/0148155280386739>

### Anderson Braga Rodrigues

Centro Universitário INTA (UNINTA)  
Sobral – Ceará  
<http://lattes.cnpq.br/3450825428854019>

### Karla Karoline Frota da Silva

Centro Universitário INTA (UNINTA)  
Sobral – Ceará  
<http://lattes.cnpq.br/7454987087366464>

### Isana Mara Aragão Frota

Centro Universitário INTA (UNINTA)  
Sobral – Ceará  
<http://lattes.cnpq.br/5050382499077368>

**RESUMO:** A tuberculose é uma doença infecciosa causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* caracterizada pela forma de bastonete delgado. Possui a capacidade de ser transmitida por via aérea e por ser um microrganismo aeróbico estrito, costuma manifestar-se nos pulmões (tuberculose pulmonar) ou ainda em outros órgãos (tuberculose extrapulmonar). O objetivo da pesquisa foi realizar um levantamento dos casos de Tuberculose na cidade de Sobral-CE nos anos de 2012 a 2016, fazendo um comparativo com os casos ocorridos no estado

do Ceará. A coleta de parte dos dados ocorreu em setembro de 2017 no Centro Epidemiológico de Sobral, buscando dados que registrassem a situação epidemiológica da Tuberculose no município de Sobral no período de 2012 a 2016. A outra parte dos dados foi coletada do Boletim Epidemiológico de Tuberculose do Estado do Ceará publicado em abril de 2017. Entre os anos de 2012 e 2016 notificou-se 866 casos na categoria de tipos de entradas, sendo o ano de 2012 o de maior registro (189 casos). Nos anos de 2013 e 2014 em relação ao ano de 2012 e no ano de 2016 em relação ao ano de 2015 ocorreu um declínio de casos novos de tuberculose. Entre os anos de 2012 e 2016 notificou-se 829 casos na categoria de situação de encerramento, sendo os anos de 2012 e 2015 com o mesmo número de registros (185 casos). Observou-se, ainda, que em todos os anos prevaleceram largamente os números de casos que atingiram a cura. O estudo possibilitou conhecer, portanto, o perfil da tuberculose no município de Sobral – CE nos anos de 2012 a 2016, onde foi possível analisar a distribuição dos casos, identificando os tipos de entrada no SINAN e a situação de encerramento dos casos.

**PALAVRAS - CHAVE:** *Mycobacterium tuberculosis*; tuberculose; aspectos microbiológicos.

## TUBERCULOSIS: ASPECTS OF THE INFECTION CAUSED BY *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* IN THE POPULATION OF SOBRAL, IN THE STATE OF CEARÁ IN THE PERIOD OF 2012-2016

**ABSTRACT:** Tuberculosis is an infectious disease caused by the bacterium *Mycobacterium tuberculosis* characterized by the shape of a thin rod. It has the ability to be transmitted by air and because it is a strict aerobic microorganism, it usually manifests itself in the lungs (pulmonary tuberculosis) or even in other organs (extrapulmonary tuberculosis). The objective of the research was to carry out a survey of the cases of Tuberculosis in the city of Sobral-CE in the years 2012 to 2016, making a comparison with the cases that occurred in the state of Ceará. The collection of part of the data took place in September 2017 at the Epidemiological Center of Sobral, looking for data that registered the epidemiological situation of Tuberculosis in the municipality of Sobral from 2012 to 2016. The other part of the data was collected from the Epidemiological Bulletin of Tuberculosis State of Ceará published in April 2017. Between 2012 and 2016, 866 cases were reported in the entry type category, with 2012 having the highest record (189 cases). In the years 2013 and 2014 in relation to the year 2012 and in the year 2016 in relation to the year 2015 there was a decline in new cases of tuberculosis. Between the years 2012 and 2016, 829 cases were reported in the category of closure situation, with the years 2012 and 2015 having the same number of records (185 cases). It was also observed that in all years the numbers of cases that reached the cure largely prevailed. The study made it possible, therefore, to know the tuberculosis profile in the municipality of Sobral - CE in the years 2012 to 2016, where it was possible to analyze the distribution of cases, identifying the types of entry into SINAN and the situation of closing cases.

**KEYWORDS:** *Mycobacterium tuberculosis*; tuberculosis; microbiological aspects.

### 1 | INTRODUÇÃO

A Tuberculose é uma doença infecciosa causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* ou Bacilo de Koch, um bastonete delgado (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Os bastonetes crescem lentamente (18 horas de tempo médio entre cada geração) pois o seu metabolismo é voltado especialmente para a construção da cápsula que o protege de agentes químicos, diferentemente da maioria das bactérias. Na superfície de um meio líquido seu crescimento parece ter a forma de um bolor, o que sugeriu o nome do gênero *Mycobacterium* (myco=fungo), gênero esse que é constituído por bacilos retos ou ligeiramente curvos com dimensões que variam entre 0,2 e 0,6 $\mu$  por 1 e 10  $\mu$ , imóveis e não formadores de esporos (MELO *et al.*, 2015).

No ano de 2015, em todo o mundo, ocorreram cerca de 10,4 milhões de novos casos de Tuberculose. Desses, 1,4 milhões de pessoas foram à óbito e atualmente é a doença infecciosa que mais mata no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Segundo Melo *et al.* (2015), *M. tuberculosis* não se apresenta de maneira livre na natureza, dependendo do parasitismo, sua transmissão ocorre principalmente por via aérea, facilitada pela aglomeração humana. Por ser aeróbico obrigatório, infecta principalmente



os pulmões (tuberculose pulmonar) pelo fato de a presença do oxigênio favorecer a sua multiplicação e a ligação do órgão com o meio externo favorecer a transmissão, porém podendo se alastrar para além dos pulmões em áreas como: ossos, meninges, rins e linfócitos (tuberculose extrapulmonar).

## 2 | OBJETIVO

Realizar um levantamento dos casos de Tuberculose na cidade de Sobral-CE nos anos de 2012 a 2016, fazendo um comparativo com os casos ocorridos no estado do Ceará.

## 3 | MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo descritivo, documental com abordagem quantitativa realizado no município de Sobral – CE. A coleta dos dados ocorreu no mês de setembro do ano de 2017 no Centro Epidemiológico de Sobral, buscando dados que registrasse a situação epidemiológica da Tuberculose no município de Sobral no período de 2012 a 2016.

As variáveis abordadas na coleta de dados em Sobral foram separadas em duas categorias: tipo de entrada e situação de encerramento. A primeira categoria teve as seguintes variáveis: Casos novos, recidiva, reingresso após abandono e pós óbito, já a segunda categoria teve as seguintes variáveis: Cura, abandono, óbito por tuberculose, óbito por outras causas, mudança de diagnóstico. A outra parte dos dados foram coletados do Boletim Epidemiológico de Tuberculose do Estado do Ceará publicado no mês de abril de 2017. As variáveis estudadas a partir do Boletim Epidemiológico de Tuberculose do Estado do Ceará foram: Casos novos, cura, abandono.

## 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os anos de 2012 e 2016 foram notificados 866 casos na categoria de tipos de entradas (Gráfico 1), em que foram encontradas da seguinte forma: no ano de 2012 foram notificados ao total 189 casos de tipo de entrada, sendo que 158 (83,60%) casos novos, 19 (10,05%) casos de reincidência, 12 (6,35%) casos de reingresso após abandono, e 0 (0%) casos de pós-óbito. No ano de 2013 foram notificados ao total 164 casos de tipo de entrada, sendo que 139 (84,76%) casos novos, 14 (8,54%) casos de reincidência, 11 (6,70%) casos de reingresso após abandono e 0 (0%) casos de pós-óbito. No ano de 2014 foram notificados ao total 168 casos de tipo de entrada, sendo que 134 (79,76%) foram casos novos, 11 (6,55%) casos de reincidência, 23 (13,69%) casos de reingresso após abandono e 0 (0%) casos de pós-óbito. No ano de 2015 foram notificados ao total 183 casos de tipo de entrada, sendo que 162 (88,52%) foram de casos novos, 12 (6,56%) casos de reincidência, 9 (4,92%) reingressos após abandono e 0 (0%) de pós-óbito. No ano de 2016 foram notificados 162 casos de tipo de entrada, sendo que 140 (86,42%) foram de casos

novos, 14 (8,64%) casos de reincidência, 7 (4,32%) casos de reingresso após abandono e 1 (0,62%) pós-óbito. Nos anos de 2013 e 2014 em relação ao ano de 2012 e no ano de 2016 em relação ao ano de 2015 ocorreu um declínio de casos novos de tuberculose, porém cabe uma reflexão no sentido de buscar entender se o declínio de novos casos se deu em decorrência da diminuição dos casos em si ou se deu em decorrência da deficiência do sistema público de saúde no aspecto de busca de novos casos e conseqüentemente um diagnóstico precoce. Em relação aos casos de reincidência percebe-se que comparando ao número total de entradas ele se manteve com pouca variação, porém junto com as entradas de reingresso após abandono se torna algo preocupante pois gera um estado de alerta com relação ao tratamento, pois o paciente pode vir a criar um tipo de infecção resistente e agravar o seu quadro, bem como também transmitir essa resistência. Um fato interessante que cabe ressaltar nessa pesquisa é que dentre essa série histórica de 5 anos é que só ocorreu um caso de entrada de pós-óbito, que é o caso que o paciente falece antes mesmo de receber o resultado da confirmação da doença.

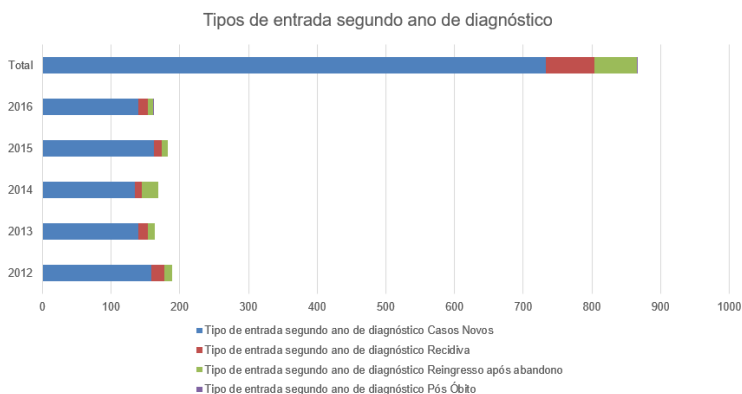


Gráfico 1 – Tipos de entrada segundo ano de diagnóstico

Fonte: SINAN

Entre os anos de 2012 e 2016 foram notificados 829 casos na categoria de situação de encerramento (Gráfico 2), em que foram encontradas da seguinte forma: no ano de 2012 foram notificados ao total 185 casos de encerramento, sendo que 155 (83,78%) foram de cura, 16 (8,65%) abandonos, 9 (4,86%) óbitos por tuberculose, 4 (2,16%) óbitos por outras causas e 1 (0,54%) mudança de diagnóstico. No ano de 2013 foram notificados ao total 155 casos, sendo que 115 (74,19%) foram de cura, 25 (16,13%) abandonos, 5 (3,23%) óbitos por tuberculose, 8 (5,16%) óbitos por outras causas, 2 (1,29%) mudanças de diagnósticos. No ano de 2014 foram notificados ao total 161 casos, sendo que 128 (79,50%) casos foram por cura, 22 (13,66%) abandonos, 6 (3,73%) óbitos por tuberculose, 5 (3,11%) óbitos

por outras causas, 0 (0%) mudanças de diagnósticos. No ano de 2015 foram notificados ao total 185 casos, sendo que 152 (82,16%) foram de cura, 15 (8,11%) abandonos, 7 (3,78%) óbitos por tuberculose, 6 (3,24%) óbitos por outras causas e 5 (2,70%) mudanças de diagnósticos. No ano de 2016 foram notificados ao total 143 casos, sendo que 121 (84,62%) foram de cura, 11 (7,69%) abandonos, 5 (3,5%) óbitos por tuberculose, 5 (3,5%) óbitos por outras causas e 1 (0,70%) mudança de diagnóstico.

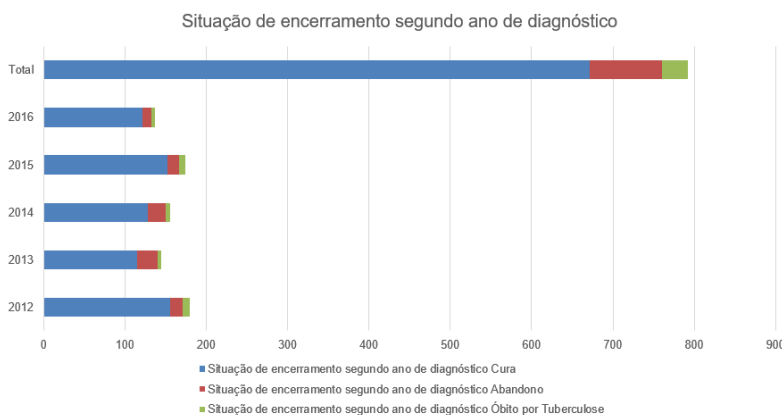


Gráfico 2 – Situação de encerramento segundo ano de diagnóstico

Fonte: SINAN

Em relação aos casos de encerramento da Tuberculose, observou-se que em todos os anos prevaleceram largamente os números de casos que atingiram a cura, demonstrando que os pacientes estão tendo um correto acompanhamento por parte dos profissionais de saúde. Os casos de abandono também aparecem de forma considerável, registrando 8,65% como média dos abandonos em relação ao total de casos de encerramento, o que causa uma certa preocupação, pois implica na persistência da fonte de infecção, além de facilitar o desenvolvimento de cepas resistentes. Observou-se também que a porcentagem de curas mediante a casos novos, chegou a ser em 2015 de 93,83% (152/162), em contrapartida o Ceará nesse mesmo período registrou 59,93% (2089/3486), o que significa que Sobral esteve bem a frente nesse período.

Em relação a porcentagem de abandonos mediante a casos novos, Sobral, no período de 2012 a 2016 ficou bem acima (12,14% média de 2011 a 2016) do que a média estipulada pelo Ministério da Saúde que seria de 5% ao ano, porém a série história demonstrou que os casos de abandono/casos novos vem diminuindo ao longo dos anos, 2012 (10,13%, 2013 (17,99%), 2014 (16,42), 2015 (9,26%), 2016 (7,86%), nota-se que o ano de 2013 foi um ano atípico pelo fato de a quantidade de abandonos ter se acentuado

bastante em relação ao número de curas e isso pode ter ocorrido por diversos fatores, alguns autores associam o abandono a melhora clínica nos primeiros meses após o tratamento, o que induz ao paciente a se autodeterminar curado, levando muitas vezes a abandonar o tratamento (VIEIRA; RIBEIRO, 2008). Outros autores citam aspectos sociais, culturais e por muitas vezes são bastantes complexos e diversos, nesse contexto, o diálogo e o foco na relação profissional-paciente podem se apresentar como recursos transformativos das práticas de cuidado e autocuidado, possibilitando a construção de ações numa perspectiva mais integral e corresponsável (CAMARGO-BORGES; JAPUR, 2008).

## 5 | CONCLUSÃO

O estudo possibilitou conhecer o perfil da tuberculose no município de Sobral – CE nos anos de 2012 a 2016, onde foi possível analisar a distribuição dos casos, identificando os tipos de entrada no SINAN e a situação de encerramento dos casos. Em relação aos tipos de entrada, observou-se a predominância de casos novos e percebeu-se que os profissionais de saúde estão atuando de forma satisfatória no que diz respeito a busca ativa dos sintomáticos respiratórios. Notou-se também que o percentual de abandonos em Sobral está bem acima do que o estipulado pelo Ministério da Saúde, que é de 5%, o que gera uma grande preocupação pois o abandono ao tratamento pode gerar uma resistência ao medicamento tomado e, por consequência, a transmissão dessa resistência por meio do ar. Um outro ponto importante que vale ressaltar é que quanto menor a taxa de abandono maior a taxa de cura. Por fim, acredita-se que a detecção precoce do problema, bem como a aplicação do tratamento adequado, seria a estratégia mais eficaz para o controle da doença.

## REFERÊNCIAS

CAMARGO-BORGES, C.; JAPUR, M. Sobre a (não) adesão ao tratamento: ampliando sentidos do autocuidado. **Texto & Contexto - Enfermagem**, v. 17, n. 1, p. 64–71, mar. 2008.

MELO, F.A.F. *et al.* F.A.F. MELO: tuberculose. In: VERONESI, R.F. *et al.* **Tratado de Infectologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2015. Cap. 66. p. 1407-1410.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

VIEIRA, A. A.; RIBEIRO, S. A. Abandono do tratamento de tuberculose utilizando-se as estratégias tratamento auto-administrado ou tratamento supervisionado no Programa Municipal de Carapicuíba, São Paulo, Brasil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, n. 3, p. 159–166, mar. 2008.

World Health Organization (org.). **Global tuberculosis report 2016**. 2016. World Health Organization. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/250441/9789241565394-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 05 out. 2020.

## **SOBRE O ORGANIZADOR**

**BENEDITO RODRIGUES DA SILVA NETO** - Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado de Mato Grosso (2005), com especialização na modalidade médica em Análises Clínicas e Microbiologia (Universidade Candido Mendes - RJ). Em 2006 se especializou em Educação no Instituto Araguaia de Pós graduação Pesquisa e Extensão. Obteve seu Mestrado em Biologia Celular e Molecular pelo Instituto de Ciências Biológicas (2009) e o Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (2013) da Universidade Federal de Goiás. Pós-Doutorado em Genética Molecular com concentração em Proteômica e Bioinformática (2014). O segundo Pós doutoramento foi realizado pelo Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde da Universidade Estadual de Goiás (2015), trabalhando com o projeto Análise Global da Genômica Funcional do Fungo *Trichoderma Harzianum* e período de aperfeiçoamento no Institute of Transfusion Medicine at the Hospital Universitätsklinikum Essen, Germany. Seu terceiro Pós-Doutorado foi concluído em 2018 na linha de bioinformática aplicada à descoberta de novos agentes antifúngicos para fungos patogênicos de interesse médico. Palestrante internacional com experiência nas áreas de Genética e Biologia Molecular aplicada à Microbiologia, atuando principalmente com os seguintes temas: Micologia Médica, Biotecnologia, Bioinformática Estrutural e Funcional, Proteômica, Bioquímica, interação Patógeno-Hospedeiro. Sócio fundador da Sociedade Brasileira de Ciências aplicadas à Saúde (SBCSaúde) onde exerce o cargo de Diretor Executivo, e idealizador do projeto “Congresso Nacional Multidisciplinar da Saúde” (CoNMSaúde) realizado anualmente, desde 2016, no centro-oeste do país. Atua como Pesquisador consultor da Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Goiás - FAPEG. Atuou como Professor Doutor de Tutoria e Habilidades Profissionais da Faculdade de Medicina Alfredo Nasser (FAMED-UNIFAN); Microbiologia, Biotecnologia, Fisiologia Humana, Biologia Celular, Biologia Molecular, Micologia e Bacteriologia nos cursos de Biomedicina, Fisioterapia e Enfermagem na Sociedade Goiana de Educação e Cultura (Faculdade Padrão). Professor substituto de Microbiologia/Micologia junto ao Departamento de Microbiologia, Parasitologia, Imunologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás. Coordenador do curso de Especialização em Medicina Genômica e Coordenador do curso de Biotecnologia e Inovações em Saúde no Instituto Nacional de Cursos. Atualmente o autor tem se dedicado à medicina tropical desenvolvendo estudos na área da micologia médica com publicações relevantes em periódicos nacionais e internacionais. Contato: dr.neto@ufg.br ou neto@doctor.com

## ÍNDICE REMISSIVO

$\beta$ -glucans 140, 143, 144, 149, 151, 152, 156

### A

Ácido Acetilsalicílico 13, 157, 158, 159

Additives 140, 144, 146, 147, 149, 151, 152, 155

Adsorção 157, 158, 159, 160, 163, 167, 168, 169, 172

Aeromonadaceae 43, 44, 48, 50

Amilase 65, 66, 68, 70, 72, 73, 95, 98, 99, 100, 101

Aplicações industriais 66, 68, 70, 78, 79, 97, 106, 132, 138

Aspectos Microbiológicos 9, 176

Aspergillus tamarisii 12, 118, 119, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 130, 131, 133, 134, 135, 136, 137, 138

### B

Biodegradação 157, 158, 159, 160, 163, 165, 166, 168, 169, 172

Biofilme 13, 58, 157, 158, 160, 161, 162, 163, 164, 168, 169, 171, 172

Bioprospecção 65, 66, 75, 138

### C

Cell Wall 12, 140, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 153, 154, 155

Celulase 95, 98, 99, 100, 102, 107, 133

Contaminação microbiana 2, 63

Contamination 10, 2, 16, 17, 43, 44, 45, 50, 51, 52, 64, 86

### D

Dengue 10, 38, 39, 40, 41, 42

Design de Plackett-Burman 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115

Diagnóstico 10, 14, 16, 17, 18, 21, 22, 36, 178, 179, 180

Diversidade Microbiana 158, 171, 172

Drenagem Urbana 2

### E

Enterobacteriaceae 44, 48, 50, 57

Enzima fibrinolítica 119, 126

Epidemiologia 34, 38, 42, 63

Escarro 10, 14, 16, 18, 19, 20, 21, 22

Esgoto 1, 2, 3, 7, 159, 161, 172

Extração 30, 33, 68, 119, 121, 126, 134, 140, 161

## **F**

Farelo de soja 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115

Fermentação 91, 97, 108, 110, 119, 121, 131, 138

Fermentação Submersa 72, 95, 97, 98, 99, 106, 107, 109, 110, 111, 116, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 138

Fitoterápicos 23

Floresta Atlântica 23

Fungo endofítico 12, 109, 110, 111

Fungo Filamentoso 102, 131, 134, 157, 164, 166, 171

Fungos 9, 11, 4, 18, 20, 23, 25, 27, 54, 64, 65, 66, 67, 68, 70, 71, 72, 74, 75, 95, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 120, 131, 132, 136, 137, 138, 160, 182

## **H**

Hidrolase 131

## **I**

Infecção Hospitalar 55, 61, 63, 64

## **L**

Linhagens de Levedura 79

Lipase 68, 75, 95, 96, 98, 99, 100, 101, 104, 137

## **M**

Mollusks 43, 44, 45

Mycobacterium tuberculosis 13, 14, 15, 17, 176, 177

## **O**

Óleos essenciais 36, 78, 79

## **P**

Pau d'álho 23

Pectinase 65, 66, 72

Protease 68, 75, 95, 96, 98, 99, 100, 104, 105, 106, 108, 122, 124, 127, 128, 129, 131, 132, 134, 136, 137, 138, 139

## **Q**

Quitinase 12, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116

## **R**

Resíduos Agroindustriais 12, 104, 130, 131, 133, 135, 138

Resistência microbiana 55, 59

## **S**

Saccharomyces Sensu Stricto 78, 79, 81, 83, 85, 86, 90, 91, 93

Sensibilidade 10, 14, 18, 23

Sistema bifásico 119

Sobral 10, 13, 14, 38, 39, 40, 41, 176, 177, 178, 180, 181

Superfícies contaminadas 55

## **T**

Tuberculose 10, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 176, 177, 178, 179, 180, 181

## **V**

Vibrionaceae 43, 44, 48, 50

## **Y**

Yeast 12, 33, 78, 79, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 151, 152, 153, 154, 155, 156



# PROJETOS INOVADORES E PRODUÇÃO INTELECTUAL NA MICROBIOLOGIA

[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) 

# PROJETOS INOVADORES E PRODUÇÃO INTELECTUAL NA MICROBIOLOGIA

[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) 