

**ANAIS**

**II SIMPÓSIO DE ENGENHARIA DE  
BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA**



**Universidade Federal de São João del-Rei**

**11 a 13 de setembro**

**Ouro Branco**

**Minas Gerais**



**II SIMPÓSIO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA**  
**11 a 13 de setembro de 2019**  
**Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil**



Universidade Federal  
de São João del-Rei



## Sumário

### II Simpósio de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

#### Organização

#### Comissão Científica

#### Programação II SIMBIO

#### Trabalhos Completos

##### *Biotecnologia na produção de alimentos e bebidas*

- Desenvolvimento de revestimentos de quitosana para a conservação pós-colheita de banana cv. 'prata'.
- Influência do revestimento de goma tara com nanoCaCO<sub>3</sub> na maturação de goiaba no pós-colheita.
- Otimização da síntese de um sensor colorimétrico aplicado a embalagens inteligentes de alimentos.
- Desenvolvimento de revestimentos de quitosana para a conservação pós-colheita de pêssego.
- Produção de filmes com adição de nanoquitosana para a preservação da goiaba no pós-colheita.

##### *Bioprocessos e Biotecnologia Assistidos por Computador*

- Modelagem e simulação do crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* em fotobiorreator.
- Produção de manganês peroxidase a partir do *Ceriporiopsis subvermispota*.
- Hidrólise enzimática da casca de café visando a obtenção de açúcares fermentescíveis.
- Lógica fuzzy como ferramenta para caracterização do ciclo celular em eucariotos.

### *Biologia Molecular e Celular Aplicadas a Bioprocessos e Biotecnologia*

- Desenvolvimento biotecnológico de *scaffold* associado a esfoliado de talco de pedra sabão para reparo ósseo.
- Efeitos indiretos da tolerância oral associado à aplicação tópica de nanomateriais no reparo de feridas.
- Tolerização oral por zeína sugere melhora no reparo ósseo em ratos Wistar.
- Produção e purificação parcial de xilanase do fungo *Kretzschmaria sp.* crescido em sabugo de milho.
- Impacto da tolerização por zeína nas propriedades biomecânicas em tíbias de ratos Wistar em fase final de recuperação pós-lesão.
- Extração de modelos de classificação para protocolos experimentais em cultura de células 3D.
- Avaliação da produção de esferoides pela técnica da gota suspensa nas linhagens celulares Vero e J774.A1.
- Avaliação da atividade antimelanoma *in vitro* da curcumina em linhagens celulares tumorais.
- Detecção de atividade antiviral em extratos de folhas e galhos de *Maytenus sp.* contra o Zika vírus (arbovírus).

### *Bioenergia, Meio Ambiente e Sustentabilidade*

- Estudo da hidrólise enzimática do amido obtido da fruta-de-lobo (*Solanum lycocarpum*).
- Síntese de nanopartículas magnéticas por coprecipitação química para remoção de corante índigo carmim em águas contaminadas.
- Indicadores do consumo de energia de diodos emissores de luz (LEDs) no tratamento de água residuária em fotobiorreatores

- Tratamento de água residuária em fotobiorretor operado em regime contínuo e iluminado por diodos emissores de luz (LED).
- Obtenção de biomoléculas com atividade antioxidante oriundas da hidrólise alcalina da casca de café.
- Degradação de fenol por *pseudomonas aeruginosa* isolada do lodo ativado de uma indústria siderúrgica.
- Produção de etanol a partir do amido obtido da fruta-de-lobo (*Solanum lycocarpum*).
- Produção de biocarvão proveniente do coco verde para a remoção do hormônio 17 $\alpha$ -Etinilestradiol.
- Produção de sabonete facial glicerinado com efeito de peeling enzimático.
- Otimização da hidrólise ácida da casca de café visando a obtenção de açúcares fermentescíveis.

#### Microbiologia

- Bioprospecção de actinobactérias produtoras de enzimas de interesse da biotecnologia agroindustrial.
- Potencial antifúngico de isolados bacterianos obtidos a partir da epiderme de anuros do quadrilátero ferrífero.
- Estudo da geração de energia em diferentes construções de células combustíveis microbianas *soil based*.
- Avaliação do efeito virucida em extratos de folhas e galhos de *Tontelea sp.* contra o Flavivírus zika.
- Prospecção de bactérias produtoras de antimicrobianos na gruta Martimiano ii, Parque Estadual do Ibitipoca – MG.
- Estudo da remoção de DQO e sulfato em células de energia microbiana utilizando diferentes membranas.
- Extração de quitina a partir da biomassa fúngica seca do fungo *Cladosporium sp.*
- O potencial antifúngico dos extratos vegetais etanólicos e acéticos de *Mentha piperita* e *Rosmarinus officinalis* contra o fitopatógeno *Rhizopus oryzae*.



### *Nanobiotecnologia*

- Avaliação da atividade antioxidante de um nanomaterial de carbono em infecções por *Zika* vírus.
- Caracterização técnico-funcional da nanoestrutura de  $\beta$ -lactoglobulina para aplicação em produtos lácteos.
- Efeito das nanopartículas de prata na sanitização de biofilmes bacterianos em placas de aço inoxidável.





II SIMPÓSIO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA  
11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil



Universidade Federal  
de São João del-Rei

### Apoiadores



PREFEITURA MUNICIPAL



Grupo Mirante da Serra





## **II Simpósio de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia**

A Biotecnologia tem sido considerada mundialmente uma das áreas de maior impacto científico e econômico nas últimas décadas, por meio dela é possível melhorar a qualidade de vida das pessoas nas mais diversas áreas da sociedade, saúde, produção agrícola, meio ambiente etc.

Quando a biotecnologia encontra a Engenharia ela se eleva à sua máxima potencialidade, pois, a engenharia com seus processos, e capacidade de escalonamento, coloca os produtos biotecnológicos ao alcance da população.

A coordenação do Curso de Engenharia de Bioprocessos se empenha em fazer com que a sociedade servida por esses profissionais os conheça mais a cada dia. Faz a gestão de um curso de qualidade, divulga a engenharia de bioprocessos e a biotecnologia para a sociedade e empresas por diferentes meios, e um deles é a promoção de eventos como esse.

A segunda edição do SIMBIO, consolida o evento e continua a missão de divulgar a Engenharia de Bioprocessos e a Biotecnologia. Obteve-se, pela primeira vez a parceria da prefeitura de Ouro Branco e de 6 empresas locais. O evento foi grandioso com mais de 100 participantes.

Nesses dois anos o evento foi institucionalizado, foi adquirido o ISSN para o livro de trabalhos, e o curso foi conectado com diferentes instituições políticas, de pesquisa e empresariais.

Mas queremos mais, queremos tornar este evento um marco regional para atrair alunos, profissionais e empresas, para que possamos convergir o encontro desses atores do setor em networking, parcerias e empregos.

A terceira edição do evento acontecerá em 2021, esperamos vocês por lá!



## **Organização**

### **Comissão Geral**

Prof. Dr. Igor José Boggione Santos - Docente do Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos (DQBIO), UFSJ.

Prof. Dr<sup>a</sup>. Daniela Leite Fabrino - Docente do Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos (DQBIO), UFSJ.

Amarildo de Sá Rocha - Discente de Engenharia de Bioprocessos, pela Universidade Federal de São João del-Rei.

### **Comissão Acadêmica**

Prof. Me. Raquel Gomes de Oliveira - Docente do Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos (DQBIO), UFSJ.

Prof. Dr. Enio Nazaré de Oliveira Júnior - Docente do Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos (DQBIO), UFSJ.

Alice Silva Braga – Discente de Engenharia de Bioprocessos, pela Universidade Federal de São João del-Rei.

### **Comissão de Logística**

Prof. Me. Marília Magalhães Gonçalves - Docente do Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos (DQBIO), UFSJ.

Lucas Henrique Alcântara Lourenço de Souza – Discente de Engenharia de Bioprocessos, pela Universidade Federal de São João del-Rei.

Isabella Anício Abib Andrade – Discente de Engenharia de Bioprocessos, pela Universidade Federal de São João del-Rei.



### **Comissão de Infraestrutura**

Prof. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Fonseca Urzedo - Docente do Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos (DQBIO), UFSJ.

Prof. Dr. Edson Romano Nucci - Docente do Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos (DQBIO), UFSJ.

Eduarda Chaboudet Heringer – Discente de Engenharia de Bioprocessos, pela Universidade Federal de São João del-Rei.

Launita Eloisa Rodrigues de Souza – Discente de Engenharia de Bioprocessos, pela Universidade Federal de São João del-Rei.

Patrícia Avelar Ribeiro – Discente de Engenharia de Bioprocessos, pela Universidade Federal de São João del-Rei.

### **Comissão de Marketing**

Prof. Dr<sup>a</sup>. Daniela Leite Fabrino - Docente do Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos (DQBIO), UFSJ.

Prof. Dr<sup>a</sup>. Ana Cláudia Bernardes Silva - Docente do Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos (DQBIO), UFSJ.

Heloísio Filipe Silva Tavares – Discente de Engenharia de Bioprocessos, pela Universidade Federal de São João del-Rei.

Tayná Drielly de Almeida Ferreira – Discente de Engenharia de Bioprocessos, pela Universidade Federal de São João del-Rei.



### **Comissão Financeira e de Patrocínio**

Prof. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria de Oliveira - Docente do Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos (DQBIO), UFSJ.

Prof. Dr. Gabriel de Castro Fonseca - Docente do Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos (DQBIO), UFSJ.

Daniel de Freitas Rodrigues – Discente de Engenharia de Bioprocessos, pela Universidade Federal de São João del-Rei.

Roberto Guimarães da Cunha Filho – Discente de Engenharia de Bioprocessos, pela Universidade Federal de São João del-Rei.

### **Comissão Científica**

*Biotecnologia na produção de alimentos e bebidas*

- Marília Magalhães Gonçalves  
Professora do curso de Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal de São João del-Rei.  
Mestre pela Universidade Federal de Viçosa.  
Área de trabalho: Projeto de Instalações Industriais para Bioprocessos, produtos lácteos fermentados, controle da qualidade microbiológica de alimentos e aproveitamento de resíduos da indústria de alimentos visando sua utilização em processos fermentativos.
- Brenner Magnabosco Marra  
Professor do curso de Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal de São João del-Rei.  
Doutor pela Universidade de Brasília.  
Área de trabalho: Processos e produtos nos setores bioenergéticos e de biofertilizantes.



- Bruna Mara Aparecida de Carvalho  
Professora do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais.  
Doutora pela Universidade Federal de Viçosa.  
Área de trabalho: Ciência e Tecnologia de Alimentos, com ênfase em Engenharia de Alimentos.

*Biologia Molecular e Celular Aplicadas a Bioprocessos e Biotecnologia*

- Isabel Cristina Braga Rodrigues  
Professora do curso de Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal de São João del-Rei.  
Mestre pela Universidade Federal de Ouro Preto.  
Área de trabalho: Biologia Molecular, Genética de Micro-organismos e Biotecnologia Ambiental.
- Daniela Leite Fabrino  
Professora do curso de Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal de São João del-Rei.  
Doutora pela Fundação Oswaldo Cruz - IOC/Fiocruz.  
Área de trabalho: Cultura de Células em 3 dimensões e suas diversas aplicações Biotecnológicas.
- Thabata Duque  
Pesquisadora da Fundação Oswaldo Cruz.  
Doutora pela Fundação Oswaldo Cruz - IOC/Fiocruz.  
Área de trabalho: Biologia Celular e Imunologia.
- Natália Rocha Barboza  
Pós doutora na Universidade Federal de Ouro Preto.

Doutora pela Universidade Federal de Ouro Preto

Área de trabalho: Biologia Molecular, Genética de Micro-organismos e Biotecnologia Ambiental

- Sandra de Cássia Dias

Professora da Universidade Federal de São João del-Rei.

Doutora pela Universidade de São Paulo.

Área de trabalho: Purificação de proteínas e produção de Biomoléculas utilizando processos fermentativos.

- Antônio Helvécio Tótola

Professor da Universidade Federal de São João del-Rei.

Doutor pela Universidade Federal de Ouro Preto.

Área de trabalho: Diagnostico molecular, proteínas recombinantes, Dengue, fungos e bactérias de interesse Biotecnológico.

### *Microbiologia*

- José Carlos de Magalhães

Professor do curso de Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal de São João del-Rei.

Doutor pela Universidade Federal de Minas Gerais.

Área de trabalho: Microbiologia, Virologia e Biotecnologia.

- Ariane Coelho Ferraz

Doutoranda no Programa de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto.

Mestre pela Universidade Federal de São João del-Rei

Área de trabalho: Microbiologia, antibacterianos e antivirais.

- Thais de Fátima Silva Moraes  
Doutoranda no Programa de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.  
Mestre pela Universidade Federal de São João del-Rei.  
Área de trabalho: Microbiologia e antivirais.
- Damiana Antônia de Fátima Nunes  
Doutoranda no Programa de Biotecnologia da Universidade Federal de São João del-Rei.  
Mestre pela Universidade Federal de São João del-Rei.  
Área de trabalho: Plantas medicinais fracionamento e identificação de compostos; câncer e metástase (metaloproteinases) e cultura de células normais e tumorais.
- Flávia Donária Reis da Silva  
Professora da Universidade Federal de São João del-Rei.  
Mestre pela Universidade Federal de Ouro Preto.  
Área de trabalho: Tratamento de efluentes, processo biotecnológico, bioremediação, remoção de metais e reator biológico.

#### *Bioenergia, Meio Ambiente e Sustentabilidade*

- Raquel Gomes de Oliveira  
Professora Substituta do Curso de Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal de São João del-Rei.  
Mestre pela Universidade Federal de Ouro Preto  
Área de trabalho: Biotecnologia Ambiental. Engenharia Ambiental e cultivo de microalgas em fotobiorretor.
- Boutros Sarrouh  
Professor do curso de Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal de São João del-Rei.

Doutor pela Universidade de São Paulo.

Área de trabalho: Biomoléculas de alto valor a partir de resíduos agroindustriais.

- Enio Nazaré de Oliveira Júnior

Professor do curso de Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal de São João del-Rei.

Doutor pela Universidade Estadual de Campinas.

Área de trabalho: Pós-colheita de frutos, reaproveitamento de subprodutos agroindustriais, biodegradação de compostos recalcitrantes e cultivo de microalgas.

- Mário Antônio Alves da Cunha

Professor do departamento de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Pato Branco.

Doutor pela Universidade de São Paulo.

Área de trabalho: Tecnologia de Bioprocessos e Ciência e Tecnologia de Alimentos.

- Fernando Masarin

Professor do Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia na Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP.

Doutor pela Universidade de São Paulo.

Área de trabalho: Ciência de materiais lignocelulósicos (madeira e bagaço de cana de açúcar).

- Ana Cláudia Bernardes Silva

Professora da Universidade Federal de São João del-Rei.

Doutora pela Universidade Federal de Minas Gerais.

Área de trabalho: Química, com ênfase em Química Ambiental, Caracterização de Materiais, Cinética Química, Catálise e em Ciência de Materiais.



*Bioprocessos e Biotecnologia Assistidos por Computador*

- José Izaquiel Santos da Silva  
Professor da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM).  
Doutor pela Universidade Federal do Rio de Janeiro.  
Área de trabalho: Modelagem, Simulação, Otimização e Controle de Processos Industriais.
- Gabriel de Castro Fonseca  
Professor da Universidade Federal de São João del-Rei.  
Doutor pela Universidade Federal de São Carlos.  
Área de trabalho: modelagem, simulação, otimização e controle de bioprocessos.
- Edson Romano Nucci  
Professor da Universidade Federal de São João del-Rei.  
Doutor pela Universidade Federal de São Carlos.  
Área de trabalho: Modelagem e Dinâmica de Bioprocessos, Controle de Bioprocessos, Planejamento de Experimentos.
- Cristiano Grijó Pitanguí  
Professor da Universidade Federal de São João del-Rei.  
Doutor pela Universidade Federal do Rio de Janeiro.  
Área de trabalho: Aprendizado de Máquina com ênfase em Computação Bioinspirada.

*Nanobiotecnologia*

- Igor José Boggione Santos  
Professor da Universidade Federal de São João del-Rei.  
Doutor pela Universidade Federal de Viçosa.



Área de trabalho: Nanotecnologia e termodinâmica.

- Jose Manoel Marconcini  
Pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.  
Doutor pela Universidade Federal de São Carlos.  
Área de trabalho: Nanotecnologia, Materiais Compósitos e Novos Materiais.
- Ana Paula Fonseca Maia de Urzedo  
Professora da Universidade Federal de São João del-Rei.  
Doutora pela Universidade Federal de Minas Gerais.  
Área de trabalho: Química Ambiental, utilizando principalmente rejeitos da mineração, carvão ativado e biocarvão para degradar poluentes orgânicos persistentes.
- Ana Maria de Oliveira  
Professora da Universidade Federal de São João del-Rei.  
Doutora pela Universidade Estadual de Campinas.  
Área de trabalho: Desenvolvimento de métodos analíticos para análise de amostras de alimentos, ambientais e combustíveis; uso de óleos vegetais para produção de combustíveis renováveis.



**II SIMPÓSIO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA**  
**11 a 13 de setembro de 2019**  
**Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil**



Universidade Federal  
de São João del-Rei

**Programação II SIMBIO**

<b>11 de Setembro</b>			
<b>Horário</b>	<b>Atividade</b>	<b>Convidado</b>	<b>Título da palestra</b>
8h às 19h	Check-in		
08:30h às 17:00h	Minicursos	Viviane Alves Gouveia (UFMG)	Vermes na Biotecnologia - Caenorhabditis elegans história e aplicações
		Mairon César Coimbra (UFSJ)	Cultura de Células e Tecidos Vegetais
		Lucas Pires (Anton Paar)	Síntese e caracterização de produtos
19:30h às 20:00h	Abertura		
20:00h às 21:00h	Juliana Saliba Empreendedorismo e startups: sua relação com ciência e pesquisa	Biotechtown	Empreendedorismo e startups: sua relação com ciência e pesquisa
21:00h	Coquetel		

<b>12 de Setembro</b>			
<b>Horário</b>	<b>Atividade</b>	<b>Convidado</b>	<b>Tema</b>
13:30h às 14:30h	Palestra Acadêmica	Rodrigo Bianchi (UFOP)	Empreender para sobreviver: ciência e tecnologia aplicadas aos sensores e biosensores.
14:30h às 15:30h	Palestra técnica	Marcelo Speziali (UFOP)	(Inovação = invenção + mercado) O papel dos pesquisadores em biociências na geração de tecnologias aplicadas ao setor produtivo
15:30h às 16:00h	Apresentação oral		
16:00h às 17:00h	Coffee Break		
17:00h às 18:00h	Palestra acadêmica	Versiani Albis Leao (UFOP)	Biotecnologia aplicada à metalurgia extrativa
18:00h às 19:00h	Apresentação de pôsteres		
19:00h às 20:00h	Palestra Acadêmica	Alberto Dávila (FIOCRUZ)	Genômics Big Data
20:00h às 21:00h	Palestra Acadêmica	Mayara Almeida Eleutério (Marketing digital)	Ser CLT ou empreender? Eis a questão. Dicas práticas sobre como se posicionar nas redes sociais, independente da sua decisão



**II SIMPÓSIO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA**  
**11 a 13 de setembro de 2019**  
**Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil**



Universidade Federal  
de São João del-Rei

<b>13 de Setembro</b>			
<b>Horário</b>	<b>Atividade</b>	<b>Convidado</b>	<b>Tema</b>
13:30h às 14:30h	Palestra Acadêmica	Glaura Goulart Silva (UFMG)	Pesquisa e desenvolvimento no Centro de Tecnologia em Nanomateriais e Grafeno - CTNano/UFMG
14:30h às 15:30h	Apresentação de pôsteres		
15:30h às 16:00h	Apresentação oral		
16:00h às 17:00h	Coffee Break		
17:00h às 19:00h	Mesa redonda	Willer Ferreira da Silva (Bionovis) Henrique Baêta (Bayer Crop Science) Anderson Machado (Alta Mogiana)	O Engenheiro de Bioprocessos na Indústria Sucroalcooleira, Farmaceutica e Agroindústria
19:00h às 20:00h	Palestra acadêmica	Erika Lorena Fonseca Costa de Alvarenga (UFSJ)	NanotechnoBone: Inovações em reparo ósseo
20:00h às 20:30h	Premiação		
20:30h	Encerramento e Confraternização		

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

## DESENVOLVIMENTO DE REVESTIMENTOS DE QUITOSANA PARA A CONSERVAÇÃO PÓS-COLHEITA DE BANANA CV. 'PRATA'

Rodrigues<sup>1</sup>, J. P.; Júnior<sup>1</sup>, E. N. O.; Santos<sup>1</sup>, I. J. B.; Campos<sup>1</sup>, C. H. S. R.

<sup>1</sup> Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Alto Paraopeba, Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos, Ouro Branco – MG.

E-mail: pr.julia28@gmail.com

### 1. Introdução

Na fruticultura brasileira, a produção de banana é o segundo mais importante, perdendo somente para a laranja (FOCO RURAL, 2017). No ranking mundial, o Brasil ocupa a 4ª posição, contribuindo com 6% da banana produzida no planeta com seus 478.765 (ha) de área plantada, segundo o IBGE (2018). Porém, o país exporta apenas 1% de sua produção. Essa inexpressiva participação do Brasil no mercado exterior, refere-se ao pós colheita, pois a maioria das frutas, especialmente em regiões tropicais, apresentam maior aceleração da maturação e deterioração em consequência das rápidas mudanças bioquímicas e fisiológicas, assim como de procedimentos de acondicionamento e práticas de manuseio inadequadas (LUVIELMO; LAMAS, 2012). Surgindo a necessidade dos produtores inserirem novas tecnologias capazes de aumentar a vida útil desses frutos, utilizando revestimentos ou embalagens comestíveis. Ainda, muitos estudos buscam da nanotecnologia, a qual possibilita um mesmo material possuir comportamentos diferentes em função do tamanho das suas partículas. Dentre as diversas nanoestruturas existentes, as de quitosana são promissoras para o uso em revestimentos, uma vez que apresentam grande potencial de formação de filmes e por possuírem atividade antimicrobiana (RAMEZANI; ZAREI; RAMINNEJAD, 2014; BENSHTIRIT *et al.* 2012). Portanto, o objetivo do presente estudo foi monitorar bananas cv.

'Prata' controle, tratadas com quitosana 1% (m/v) e nanoquitosana 5% (m/v) quanto aos parâmetros pós colheita: coloração, perda de massa e firmeza.

### 2. Material e métodos

Os revestimentos foram preparados em beckeres de vidro nas concentrações de 1% (m/v) de quitosana e 5% (m/v) de nanoestruturas de quitosana. Para o primeiro, diluiu-se 1% (m/v) em uma solução de ácido acético 1% (v/v). Esta etapa foi feita sob agitação a 25°C (Agitador magnético DT3120H, DiagTech) por 24 horas para a completa solubilização da quitosana. Já as nanoestruturas de quitosana 5% (m/v) foi obtida, com algumas modificações, em acordo com Calvo *et al.*, (1997) e Vimal *et al.*, (2012) a qual possui tamanho  $75,33 \pm 0,394$  nm, conforme o grupo Nanotec. Os frutos foram lavados em água corrente, imersos em solução de hipoclorito de sódio 1% (v/v) por 5 minutos para desinfecção e lavados novamente com água. Estes foram dispostos na bancada cobertas com papel e secos ao ar livre. Após, foram selecionadas 180 bananas, divididas em 2 grupos: não destrutíveis e destrutíveis. Para os destrutíveis foram utilizados porções de 9 frutos para o controle (sem revestimento), quitosana 1% (m/v) e 5% nanoquitosana (m/v) por dia de análise constituindo as amostras do dia zero (um dia após a colheita) ao 15º dia, com intervalos de 3 dias entre os estágios de amadurecimento (0,3,6,9,12 e 15). Para os não destrutíveis, foram utilizados porções de 6

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

frutos para cada revestimento e para o controle. Em seguida as bananas foram imersas nos revestimentos e para a secagem, os frutos foram pendurados em varal e retiradas no dia seguinte para serem submetidas as análises de perda de massa, coloração e teste de firmeza. Um grupo contendo 6 frutos (não destrutíveis) foi fotografado utilizando-se a mesma câmera fotográfica (Smartphone Moto G 3a), no mesmo local do laboratório e na mesma hora do dia, durante os dias de análise. A alteração da coloração das bananas durante o amadurecimento, seguiu o protocolo descrito por Yam e Papadakis (2004), com adaptações, utilizando-se o PhotoShop para análise qualitativa do índice  $L^*$   $a^*$   $b^*$  e representadas pelo disco cromatográfico.

A massa dos frutos (não destrutíveis) foram obtidas utilizando-se uma balança analítica (Balança analítica ED2245, Sartorius). Desta forma, determinou-se a perda de massa pela diferença entre a massa inicial e a massa após cada período de armazenamento. Os resultados da perda de massa foram expressos em porcentagem, considerando a massa do fruto no dia zero como 100%.

A firmeza foi determinada com o auxílio de um dinamômetro digital (Dinamômetro digital DD-2000, Instrutherm), ponteira com 8 mm de diâmetro e ponta plana, fazendo-se 3 leituras equidistantes na região equatorial dos 2 frutos (inteiros e com casca), de cada repetição (triplicata). Os resultados foram expressos em Newton (N).

### 3. Resultados e Discussão

Uma maneira de comparar a escala de cor de diferentes amostras consiste em utilizar o sistema CIE  $L^*$   $a^*$   $b^*$ . Neste tratamento, a coordenada  $a^*$  foi analisada para avaliar a coloração verde das bananas, sendo que valores positivos tendem ao vermelho e negativos ao verde (+60/-60) (SIQUEIRA, 2013). A Figura 1 apresenta a sequência de fotos obtidas para fazer a análise da cor da casca das bananas.

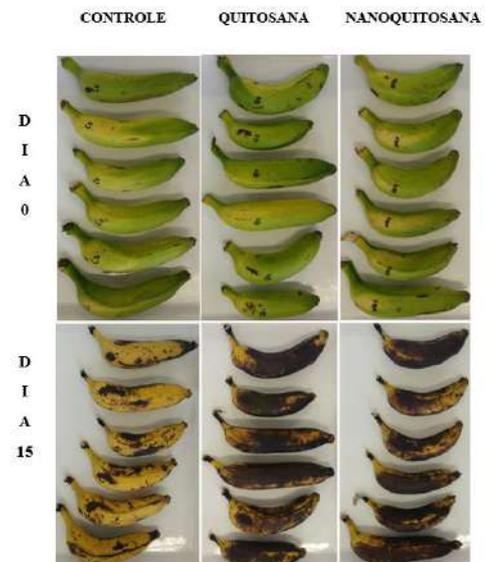


Figura 1 - Grau de amadurecimento em bananas cv. 'Prata' tratadas com quitosana, nanoquitosana e o controle em 15 dias.

Fonte: Próprio Autor, 2019.

As bananas do cv. 'Prata' no dia 0 ao invés de estarem completamente verdes encontravam-se mais verdes do que amarelas. Tal fato foi devido a um pré tratamento, com gás etileno, que as pencas de banana receberam e que atuam como hormônio do amadurecimento dos frutos (ELLU, 2016). Além disso, pode-se observar que os frutos já apresentavam manchas características da antracnose, que caracteriza-se por lesões escuras e deprimidas sobre o fruto, sendo responsável por 20% a 30% das lesões desenvolvidas no mesmo, causada pelo fungo *Colletotrichum musae* que infecciona nos frutos ainda verdes no campo (SULALI *et al.*, 2004). Analisando-se o dia 15, as bananas do grupo controle apresentaram-se mais conservadas, em relação ao grupo que recebeu revestimento. Supõe-se que a aplicação curativa da quitosana e da nanoquitosana nos frutos, induziu o aumento da intensidade de antracnose. Assim como no trabalho de Aguiar (2011). A Figura 2 mostra a dispersão dos resultados do amadurecimento visível em um disco

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

cromatográfico, no qual é possível comparar a coloração final da casca.

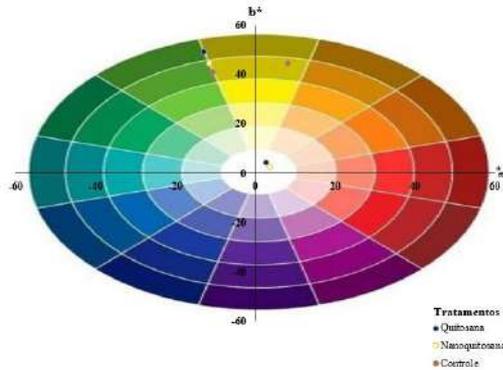


Figura 2 - Disco cromatográfico com as cromas \*a e \*b das amostras no decorrer dos 15 dias em todos revestimentos submetidos.

Fonte: Próprio Autor, 2019.

Todas as amostras no dia 0 estavam no mesmo estágio de maturação, mais próximas da cor verde. Após 15 dias, houve uma dispersão das amostras com revestimento em relação ao controle, em que os valores de a\* tenderam para o vermelho e de b\* entre o amarelo mais escuro e mais claro, demonstrando uma dispersão mais lenta em 15 dias. O disco comprova este dado, uma vez que o controle mostrou-se mais conservado em relação as amostras com revestimento, apresentando senescência.

A perda de massa ocorre devido ao processo de transpiração, a qual acarreta um amolecimento dos tecidos, tornando os frutos mais suscetíveis às deteriorações e a alterações na cor, sabor e textura (BRAGA, 2015). A perda de massa fresca foi crescente e linear durante os 15 dias de armazenamento, de acordo com a Figura 3.

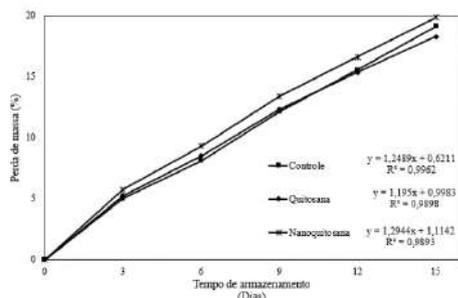


Figura 3 - Perda de massa (%) da banana cv. 'Prata' sob diferentes tratamentos durante 15 dias.

Fonte: Próprio Autor, 2019.

Constatou-se o aumento da perda de massa durante todo o período analisado, sendo que a mínima foi de  $(19,85\% \pm 1,55)$  para as bananas revestidas com nanoquitosana e a maior perda foi observada para o controle, ou seja o revestimento preservou a perda de massa, ao final do armazenamento ( $21,7^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  e  $73\% \pm 2\%$  UR). De acordo com alguns estudos, a perda de massa varia de acordo com as condições experimentais utilizadas, como relatadas por Aguiar (2011) em seus estudos. Portanto, pode-se dizer que a temperatura e umidade relativa são os principais fatores a alterar a taxa de transpiração dos frutos (PEREIRA *et al.* 2005).

Os frutos analisados apresentaram um decaimento da firmeza durante os dias de amadurecimento, como se pode observar na Figura 4.

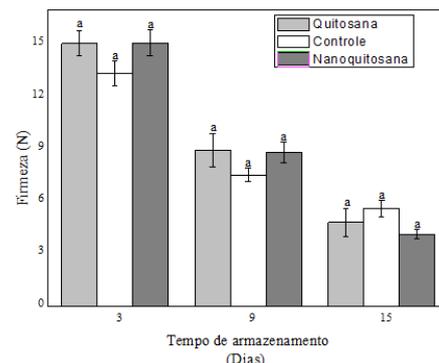


Figura 4 - Valores da firmeza da banana cv. 'Prata' submetida a revestimentos de quitosana e nanoquitosana, para o dia 3, 9 e 15.

Fonte: Próprio Autor, 2019.

No dia 3 a firmeza média foi de  $14,51 \pm 0,30$  N. No último dia de análise, dia 15, as bananas do grupo controle mostravam-se mais firmes em relação às outras, tratadas. Com firmezas iguais a  $5,60 \pm 0,28$  N para as controle,  $4,80 \pm 0,38$  N para as com quitosana e  $4,13 \pm 0,88$  para as com nanoquitosana. Esse comportamento contrário, ocorreu devido ao estado de senescência muito avançado desses dois últimos grupos, que apresentavam antracnose. O teste de média de Tukey constatou que os resultados obtidos para os tratamentos não foram diferentes entre si.

#### 4. Conclusão

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

Conclui-se que não foi possível prolongar a vida útil da banana cv. “Prata” utilizando os revestimentos nas condições citadas. Uma vez que não houve retardo do amadurecimento dos frutos durante 15 dias. Porém, como as bananas já apresentavam traços da doença antracnose desde o dia 0, a aplicação do revestimento a base de quitosana 1% (m/v) e de nanoquitosana 5% (m/v) não teve ação curativa nas bananas, pois aumentou a incidência da doença não sendo capaz de reduzir o surgimento de lesões nos frutos em oposição ao controle, que manteve-se mais conservado até o dia 15.

### 5. Referências

1. AGUIAR, R. M. *Efeito da quitosana sobre a antracnose e características físicas e químicas de frutos de cultivares de bananeiras*. Dissertação (Pós graduação em Produção Vegetal no Semiárido), 2011. 84 p. Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, 2011.
2. BRAGA, M. A. *Parede celular: Análises do mecanismo de perda de firmeza de goiabas cv. Pedro Sato durante o amadurecimento em temperatura ambiente*. 2015. 94 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.
3. CALVO P, REMUÑAN-LOPEZ C, VILA-JATO JL, ALONSO MJ. 1997. Novel hydrophilic chitosan polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. **J Appl Polym Sci**, 63, 125-132.
4. IBGE. **Em janeiro, IBGE prevê safra 6,0% inferior à de 2017**. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/19942-em-janeiro-ibge-preve-safra-6-0-inferior-a-de-2017>. Acesso em: 17 de março de 2019.
5. ELLU. **Parte 3: O Etileno na pós-colheita**. Disponível em: <http://www.ellu.com.br/noticias/parte-3-o-etileno/>. Acesso em 22 de março de 2019.
6. LUVIELMO, M. M.; LAMAS, S. V. Revestimentos comestíveis em frutas. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, Pelotas, v. 8, n. 1, p. 8 – 15, 2012.
7. PEREIRA, T.; CARLOS, L. A.; OLIVEIRA, J. G.; MONTEIRO, A. R. Características físicas e químicas de goiaba cv. Cortibel (*Psidium guajava*) estocadas sob refrigeração em filmes x-tend. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 16, n. 1, p. 11-16, 2005.
8. RAMEZANI, Z.; ZAREI, M.; RAMINNEJAD, N. Comparing the effectiveness of chitosan and nano chitosan coatings on the quality of refrigerated silver carp fillets. **Food Control**, v. 51, p. 43-48, 2015.
9. SIQUEIRA, B. S. *Desenvolvimento dos fenômenos de escurecimento e endurecimento em feijão carioca: Aspectos bioquímicos e tecnológicos*. 2013. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de alimentos) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.
10. SULALI, A. et al. Fungal pathogens associated with banana fruit in Sri Lanka, and their treatment with essential oils. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 157, n. 1, p. 91-97, 2004.
11. FOCO RURAL. **Banana atrai produtores como ótima opção de investimento**. Disponível em: <http://www.focorural.com/> Acesso em 13 de agosto de 2019.
12. VIMAL, S., TAJU, G., NAMBI, K.S.N., ABDUL MAJEED, S., SARATH BABU, V., RAVI, M., SAHULHAMEED, A.S., 2012. **Synthesis and characterization of CS/TPP nanoparticles for oral delivery of gene in fish**. **Aquaculture** 358/359, 14–22.
13. YAM, Kit L.; PAPADAKIS, Spyridon E. A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. *Journal of Food Engineering*. v. 61, n. 1, p. 137-142, 2004.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

## INFLUÊNCIA DO REVESTIMENTO DE GOMA TARA COM $\text{nanoCaCO}_3$ NA MATURAÇÃO DE GOIABA NO PÓS-COLHEITA

Bianchi<sup>1</sup>, J. R. O.; Schlogl<sup>2</sup>, A. E.; Santos<sup>2</sup>, I. J. B. Oliveira Junior<sup>2</sup>, E. N. e Coimbra<sup>3</sup>, J. S. R.

<sup>1</sup> Universidade Federal de São João del Rei Campus Alto Paraopeba (CAP), Departamento de Engenharia Química (DEQUI)/Programa de pós-graduação em Engenharia Química (PPGEQ), Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Federal de São João del Rei Campus Alto Paraopeba (CAP), Departamento de Química Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos (DEQBio)/Engenharia de Bioprocessos, Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

<sup>3</sup> Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

E-mail: igorboggione@ufsj.edu.br

### 1. Introdução

A goiaba (*Psidiumguajava* L.) é uma fruta original da América central, presente também na América do Sul e Ásia, da família das Myrtaceae (Kadam et al., 2012). Faz parte da economia doméstica do Brasil, um dos maiores produtores mundiais (FAO, 2018), sendo de interesse de consumo devido as propriedades nutricionais, como a presença das Vitaminas A e C (Menzel, 1985; Nimisha et al., 2013). A demanda de consumo e a produção de goiaba vem cobrando dos produtores investimentos em novas tecnologias que ampliem a produção, a qualidade e o tempo de vida útil da fruta, principalmente, combatendo doenças fúngicas causadas por contaminação no pós colheita (Amadi et al., 2013).

O uso de biopolímeros para a confecção de embalagens para alimentos vem substituindo os materiais poliméricos derivados de petróleo (Petersen et al., 1999), devido sua atoxicidade, biodegradabilidade, menor impacto ambiental e mantendo a capacidade de garantir a segurança alimentar (Rhim et al., 2013).

A adição de nanomateriais a embalagens de alimentos vem ganhando espaço no setor de embalagens alimentícias por possibilitar inserir nas embalagens pelas propriedades antimicrobianas (Biji et al., 2015), resistência

mecânica, maior barreira contra oxigênio e transferência de massa de outros compostos e diminuição de perda de água (Sozer e Kokini, 2009; He et al., 2016).

Sendo assim, esse trabalho objetiva fazer análises físico-químicas em goiaba após aplicação de revestimento de Goma Tara incorporado com nano carbonato de cálcio, em diferentes concentrações, avaliando a influência na maturação do fruto.

### 2. Material e Métodos

#### 2.1. Síntese de $\text{nanoCaCO}_3$

A síntese de nanoestrutura de Carbonato de Cálcio ( $\text{nanoCaCO}_3$ ), seguiu metodologia otimizada por Silva et al. (2018).

#### 2.2. Seleção e Preparo das Goiabas

As goiabas foram colhidas e cedidas por um produtor local e ainda contendo o engaço. Lavou-se com solução de Hipoclorito de Sódio comercial 10 % (v/v) por 10 min, passou-se por água corrente para remover o excesso e secou-se e separou-se 15 frutos no Grupo 1 (G1) para análises não destrutivas e 75 frutos no Grupo 2 (G2) para análises destrutivas, sendo 15 frutos para cada dia de análise.

#### 2.3. Preparo e Aplicação do Revestimento

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

Preparou-se 2 soluções de Goma Tara (GastronomyLab) 1,5 % (m/v), diluindo-se gradativamente sob agitação (Ultraturrax, Fisaton 718D) a 25 °C. Em uma solução adicionou-se 0,5 % (m/v) de nanoCaCO<sub>3</sub>.

Em cada grupo (G1 e G2) dividiu-se em 3 subgrupos, sendo 5 goiabas para o controle (sem aplicação de revestimento), 5 goiabas tratadas com Goma Tara (GT) e 5 goiabas tratadas com Goma Tara adicionadas de 0,5 % de nano CaCO<sub>3</sub> 0,5 % (m/v) (GT+0,5%).

Aplicou-se o revestimento duas vezes, sendo a segunda aplicação feita após a secagem da primeira, para conferir maior homogeneidade.

### 2.4. Análises Não Destrutivas

As análises não destrutivas realizadas foram a perda de massa e índice de escurecimento, fez-se nos dias 0, 3, 8, 10 e 16, contando após a chegada dos frutos. Fez-se o teste Tukey utilizando o *software Statistica10* e a construção gráfica no Origin8.

Pesou-se as goiabas no dia 0, após a secagem do revestimento, e pesou-se novamente nos dias de análises, os resultados são expressos em porcentagem de perda de massa descritos na equação (1).

$$\%PM = 100 - \left( \frac{\text{massa final}}{\text{massa inicial}} \right) * 100 \quad (1)$$

Fez-se a análise qualitativa das goiabas no software PhotoShop para a determinação dos índices L\*, fator que indica a luminescência, a\*, fator que indica a variação entre verde e vermelho e o componente b\* que indica a variação entre azul e amarelo (Yam e Papadakis, 2004).

O índice de escurecimento é calculado pelas equações (2) e (3), sendo BI o índice de escurecimento e x um parâmetro para o cálculo de BI (Martinez-Alvarenga *et al.*, 2014).

$$x = \frac{a+1,75(L)}{5,645(L)+a-3,012(b)} \quad (2)$$

$$BI = \frac{100*(x-0,31)}{0,721} \quad (3)$$

### 2.5. Análises Destrutivas

As análises destrutivas realizadas foram a firmeza e açúcares redutores, fez-se nos dias 0, 3, 8, 10 e 16, contando após a chegada dos frutos. Fez-se o teste Tukey utilizando o software Statistica10 e a construção gráfica no Origin8.

Realizou-se a análise de firmeza por meio do penetrômetro digital (DD-2000 Instrutherm), penetrando as goiabas em quatro pontos equidistantes. O aparelho fornece o valor de força, em newton (N), máxima para a sonda penetrar o fruto, valor diretamente proporcional a resistência do fruto ao amadurecimento

Realizou-se o preparado do extrato seguindo a metodologia de Lane-Enyon, em que as amostras foram extraídas por etanol 95% durante 24 h agitadas por 1 h em shaker a 28°C a uma rotação de 100 rpm. Aqueceu-se as soluções, em chapa de aquecimento a 100 °C até restar aproximadamente 500 µL e adicionou-se 10 mL de água destilada (Helvich, 1990).

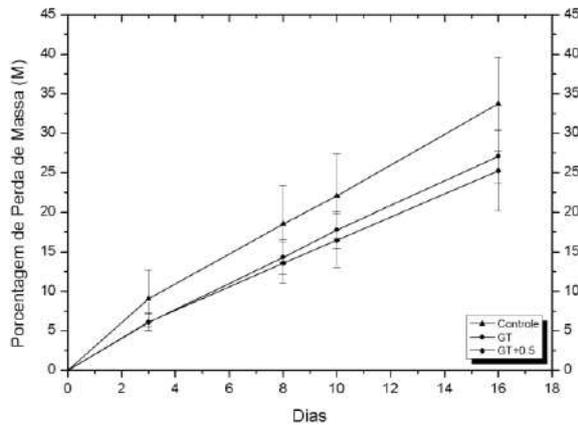
Determinou-se a concentração de açúcares redutores adicionando a 200 µL de extrato 200 µL de DNS (Ácido 3,5-Dinitrosalicílico), após aquecer por 5 minutos diluiu-se com água destilada e fez-se leitura no espectrofotômetro (IL-592 Spectrophotometer, IONLAB, Paraná, Brasil) a 520 nm (Nelson, 1944). Os resultados foram expressos em mg de glicose/100 g de polpa.

### 3. Resultados e Discussão

A porcentagem de perda de massa analisada no grupo 1 apresentou um comportamento linear conforme mostra a Figura 1, observa-se que o controle ao final do decimo sexto dia de tratamento apresentou uma perda maior de massa, de 33,70 % PM, em comparação as goiabas do subgrupo GT+0,5% que apresentou 25,35 % PM após o mesmo período de armazenamento. A perda de massa das goiabas dá-se pela desidratação por transpiração durante o processo de maturação (Forato *et al.*, 2015). Os resultados obtidos mostraram que os frutos com revestimento de goma tara adicionados de 0,5 % (m/v) de nano CaCO<sub>3</sub>

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

possibilitou a maior retenção de água sendo mais eficiente para preservar a massa das frutas em comparação ao controle e ao subgrupo GT.



**Figura 1.** Curvas do comportamento da perda de massa (%PM) do G1 em cada condição que as goiabas foram submetidas

A Tabela 1 apresenta o índice de escurecimento (BI) calculado. Observa-se que ao comparar os diferentes tratamentos em seus dias não há diferença estatística significativa das médias entre os dias iniciais de maturação. Após o dia 8, começa a divergir o controle dos demais tratamentos. As goiabas tratadas mantiveram por mais tempo a coloração verde, sendo a GT+0,5% que mais preservou a coloração das goiabas.

**Tabela 1.** índice de escurecimento (BI) das Goiabas calculados com seus respectivos testes de Tukey ( $p < 0,05$ ).

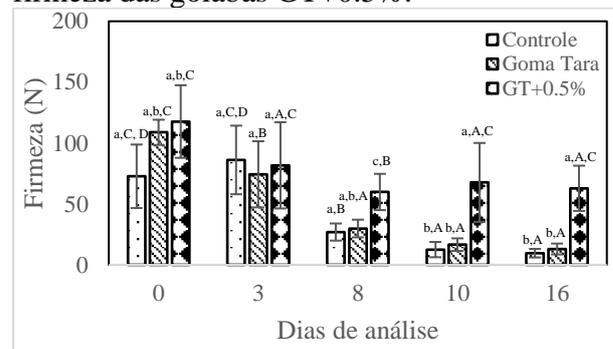
Índice de Escurecimento (BI)			
Dias	Controle	GT	GT+0,5%
0	141,91±20,34 <sup>aA</sup>	155,59±20,58 <sup>aA</sup>	172,36±38,64 <sup>aA</sup>
3	156,76±46,39 <sup>aA,B,C</sup>	138,61±16,83 <sup>aA,B</sup>	139,58±13,74 <sup>aA</sup>
8	186,68±17,47 <sup>bA,B,C</sup>	138,48±12,03 <sup>aA,B</sup>	152,91±12,60 <sup>bA,B</sup>
10	209,28±28,77 <sup>cA</sup>	154,11±11,75 <sup>aA</sup>	159,23±20,42 <sup>aA</sup>
16	188,85±23,68 <sup>bA,B,C</sup>	144,76±7,85 <sup>bA,B</sup>	134,88±41,27 <sup>aB,A</sup>

Os índices do grupo Tukey em minúsculo representa as análises das médias em linhas e em maiúsculo as análises em coluna.

A Figura 2 mostra as medias da força necessária para penetrar as goiabas, ou seja, a firmeza dos frutos em newton (N), no decorrer do tempo de armazenamento ocorrem reações de hidrolises enzimáticas que degradam componentes da parede celular, fazendo a metilação da pectina, responsável por diminuir

a resistência mecânica (Azzolini et al., 2005) no decorrer dos dias de armazenamento observa-se que o controle apresentou maior decaimento da firmeza em comparação com as goiabas tratadas e aquelas que mantiveram maior resistência foram as goiabas do subgrupo GT+0,5%.

Pelo teste de Tukey, não houve diferença significativa entre as medidas de firmeza nos diferentes tratamentos comparando-os entre si, em cada dia. A mesma análise estatística comparando os dias de cada tratamento mostram que houve diferença estatística entre as médias do dia 0 e dia 16 do controle, e não houve diferença significativa entre as médias de firmeza das goiabas GT+0,5%.



**Figura 2.** Gráfico de Firmeza, em Newton (N), de cada condição que as goiabas foram submetidas durante os dias de tratamento com seus respectivos testes de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os índices do grupo Tukey em minúsculo representa as análises das médias entre as diferentes condições e em maiúsculo as análises entre os dias.

A Tabela 2 mostra que não houve diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos nos dias das médias de concentração de açúcares redutores, porém ao comparar os tratamentos entre os dias, houve diferença significativa. Ocorreu um aumento na concentração de açúcares, mesmo com a aplicação de revestimento, ou seja, o revestimento com nano não interfere nessa característica da maturação da goiaba.

**Tabela 2.** Concentração de açúcares redutores das goiabas com seus respectivos testes de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Açúcares Redutores (mg de glicose/100 g de goiaba)			
Dias	Controle	GT	GT+0,5%
0	13,89±0,12 <sup>b,C</sup>	13,51±0,28 <sup>a,B</sup>	13,61±0,17 <sup>b,A</sup>
3	11,92±0,27 <sup>a,B</sup>	12,23±0,26 <sup>a,b,A,B</sup>	11,10±0,17 <sup>b,A</sup>

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

8	21,07±1,42 <sup>b,D</sup>	24,58±0,14 <sup>a,A</sup>	24,10±1,90 <sup>b,B</sup>
10	25,74±0,24 <sup>a,A</sup>	25,51±1,03 <sup>a,C</sup>	26,06±0,60 <sup>a,C</sup>
16	25,61±0,92 <sup>a,A</sup>	24,50±2,42 <sup>a,C</sup>	26,12±0,55 <sup>a,A,B,C</sup>

Os índices do grupo Tukey em minúsculo representa as análises das médias em linhas e em maiúsculo as análises em coluna.

#### 4. Conclusão

O revestimento de goma tara com nano CaCO<sub>3</sub> foi eficiente na preservação das goiabas pós-colheita, quando analisado o índice de escurecimento, perda de massa e firmeza. Esses revestimentos biodegradáveis propiciam às frutas um maior tempo para a maturação sem alterar drasticamente essas propriedades analisadas neste trabalho, tornando-as com maior valor agregado.

#### 5. Referências Bibliográficas

AMADI, J. et al. Isolation and identification of fungi involved in the post-harvest spoilage of guava (*Psidium guajava*) in Awka metropolis. v. 4, n. 10, p. 8269, 2013.

AZZOLINI, M. et al. Ripening of "Pedro Sato" guava: study on its climacteric or non-climacteric nature. v. 17, n. 3, p. 299-306, 2005. ISSN 1677-0420.

BIJI, K. et al. Smart packaging systems for food applications: a review. v. 52, n. 10, p. 6125-6135, 2015. ISSN 0022-1155.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Organização das Nações Unidas. **MINOR TROPICAL FRUITS: Mainstreaming a niche market.** 2018. Disponível em: <<http://www.fao.org/news/story/en/item/1193381/icode/>>. Acesso em: 04 ago. 2019.

FORATO, L. A. et al. Effect of cashew gum-carboxymethylcellulose edible coatings in extending the shelf-life of fresh and cut guavas. v. 5, p. 68-74, 2015. ISSN 2214-2894.

HE, X.; HWANG, H.-M. J. J. O. F.; ANALYSIS, D. Nanotechnology in food science: functionality, applicability, and safety assessment. v. 24, n. 4, p. 671-681, 2016. ISSN 1021-9498.

HELVICH, K. Official methods of analysis. Association of official analytical chemists. 1990

KADAM, D. M. et al. Evaluation of guava products quality. v. 2, n. 1, p. 7-11, 2012.

MARTINEZ-ALVARENGA, M. et al. Effect of Maillard reaction conditions on the degree of glycation and functional properties of whey protein isolate–Maltodextrin conjugates. v. 38, p. 110-118, 2014. ISSN 0268-005X.

MENZEL, C. J. Q. A. J. Guava: An exotic fruit with potential in Queensland. v. 111, n. 2, p. 93-98, 1985. ISSN 0157-7786.

NELSON, N. J. J. B. C. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. v. 153, n. 2, p. 375-380, 1944.

NIMISHA, S. et al. Molecular breeding to improve guava (*Psidium guajava* L.): current status and future prospective. v. 164, p. 578-588, 2013. ISSN 0304-4238.

PETERSEN, K. et al. Potential of biobased materials for food packaging. v. 10, n. 2, p. 52-68, 1999. ISSN 0924-2244.

RHIM, J.-W.; PARK, H.-M.; HA, C.-S. J. P. I. P. S. Bio-nanocomposites for food packaging applications. v. 38, n. 10-11, p. 1629-1652, 2013. ISSN 0079-6700.

SOZER, N.; KOKINI, J. L. J. T. I. B. Nanotechnology and its applications in the food sector. v. 27, n. 2, p. 82-89, 2009. ISSN 0167-7799.

YAM, K. L.; PAPADAKIS, S. E. J. J. O. F. E. A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. v. 61, n. 1, p. 137-142, 2004. ISSN 0260-8774.

#### 6. Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pelo financiamento e ao CiPharma-UFOP pela utilização do equipamento adquirido pelo projeto FAPEMIG CDS-APQ 01510-14: "Manutenção do inovador sistema analítico AF200 Asymmetric Flow Field Flow Fraction"

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

## OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DE UM SENSOR COLORIMÉTRICO APLICADO A EMBALAGENS INTELIGENTES DE ALIMENTOS

Vidal<sup>1</sup>, I. F. S.; Santos<sup>2</sup>, I. J. B.

<sup>1</sup>Universidade Federal de São João del-Rei, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

<sup>2</sup> Universidade Federal de São João del-Rei, Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos

E-mail: isabelafsvidal@gmail.com

### 1. Introdução

O contínuo crescimento das indústrias de processamento de alimentos, bem como o aumento das expectativas em relação ao consumo de produtos frescos, que não apresentem prejuízos à sua qualidade, vêm se destacando no mercado de alimentos. Como consequência, há uma demanda crescente para que sejam desenvolvidas novas e avançadas tecnologias que ampliem a proteção e preservação dos alimentos, garantindo a segurança de consumo (PARK et al., 2015).

O mercado de carnes, em especial, exibe um cuidado redobrado quando se trata da qualidade do produto (XIAO-WEI et al., 2014). A carne suína, por exemplo, revela-se como um alimento altamente perecível, que sofre com os efeitos da deterioração quando não se apresenta devidamente embalada e preservada. Assim, torna-se uma importante prerrogativa para os consumidores, o conhecimento do estado de conservação do alimento que será adquirido (KANG; KIM; KWON, 2009).

A incorporação de sensores a embalagens convencionais dá origem às embalagens inteligentes, capazes de fornecer informações sobre o estado de conservação do alimento pelo monitoramento de suas condições de armazenamento (MAHALIK, 2009). O emprego de pigmentos naturais como sensores colorimétricos apresenta-se como um método vantajoso, uma vez que esses pigmentos não reagem quimicamente com a embalagem inteligente.

Xiao-Wei et al. (2014) desenvolveram sensores colorimétricos fundamentados em quatro pigmentos naturais distintos e, entre eles, o arroz negro figurou como um extrato bastante sensível à detecção de deterioração em carnes suínas, por apresentar moléculas denominadas antocianinas, que interagem bem com compostos formados na degradação da proteína.

A fim de se determinar a qualidade da carne por meio de sensores, é imprescindível o entendimento de seus mecanismos de deterioração. Os tecidos da carne suína são compostos primordialmente por proteínas, lipídios, carboidratos, compostos inorgânicos e umidade (TOLDRÁ, 2008). Durante a degradação microbiana, estes substratos são quebrados e originam novos compostos que impactam de forma negativa a qualidade dos produtos e, por serem capazes de interagir com sensores, indicam o estado de conservação do alimento por alterações em sua coloração (DAVE; GHALY, 2011).

Esta pesquisa envolve o estudo de composições ótimas para o desenvolvimento de um sensor colorimétrico baseado em resíduo de arroz negro, para aplicação futura na sinalização de processos de deterioração em carnes suínas.

### 2. Material e métodos

#### 2.1. Material

O resíduo de arroz negro comercial, cedido pela empresa Arroz Ruzene (Brasil), foi

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

utilizado para a extração do pigmento natural antocianina, bem como polióxido de etileno (PEO) 1500 da Sigma Aldrich (EUA), ácido clorídrico (HCL) 1 mol.L<sup>-1</sup> da Dinâmica Química Contemporânea Ltda. (Brasil) e água destilada. Para o preparo da solução filmogênica, foi utilizada a goma carboximetilcelulose (CMC), cedida pelo Laboratório da Universidade Federal de Viçosa (Brasil) e glicerol da Synth (Brasil) como agente plastificante.

## 2.2. Extração do pigmento antocianina em solução polimérica

Em frascos *erlenmeyer* de 250 mL, diferentes concentrações de soluções poliméricas (5%, 10%, 15%, 30% e 45% m/v) foram preparadas pela dissolução do PEO 1500 e resíduo de arroz negro moído em água destilada com pH ácido, de acordo com procedimento estabelecido por Fernandes (2018). As soluções foram agitadas a 200 rpm em um *shaker* por 25 h, protegidas da luz. Após a retirada dos extratos do *shaker*, os mesmos foram centrifugados por 10 min a 3500 rpm para a retirada de resíduos sólidos.

## 2.3. Produção dos filmes pelo método de casting

Os filmes foram confeccionados a partir das soluções poliméricas enriquecidas com antocianina, solução de carboximetilcelulose e glicerol, pelo método de *casting*, de acordo com o planejamento experimental DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) pelo *software* Statistica 7.0®. Os planejamentos realizados englobam 17 experimentos, cada um deles, e podem ser observados nas Tabelas 1 e 2. As tabelas trazem as concentrações de reagentes utilizadas para cada filme preparado. As concentrações de extrato observadas nas tabelas supracitadas sofreram variações apenas quanto ao processo de extração, enquanto nos filmes, mantiveram-se fixas em 30% m/v. Um volume de, aproximadamente, 30 mL de cada uma das soluções filmogênicas foi adicionado a uma

placa de vidro. Posteriormente, as placas foram submetidas à temperatura de 40 °C em estufa de secagem até que estivessem completamente secas. Após o processo de polimerização nas placas, os filmes foram removidos de forma cuidadosa com o auxílio de uma espátula.

Tabela 1 - 1º Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) desenvolvido.

Experimento	PEO1500 (%)	CMC (%)	GLICEROL (%)
1	15	0.5	3
2	15	1.5	9
3	45	0.5	9
4	45	1.5	3
5	30	1	6
6	15	0.5	9
7	15	1.5	3
8	45	0.5	3
9	45	1.5	9
10	30	1	6
11	4.9	1	6
12	55.1	1	6
13	30	0.16	6
14	30	1.84	6
15	30	1	0.98
16	30	1	11.02
17	30	1	6

Concentrações dos compostos em m/v.

Tabela 2 - 2º Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) desenvolvido.

Experimento	PEO1500 (%)	CMC (%)	GLICEROL (%)
1	5	0.5	2
2	5	1.5	6
3	15	0.5	6
4	15	1.5	2
5	10	1	4
6	5	0.5	6
7	5	1.5	2
8	15	0.5	2
9	15	1.5	6
10	10	1	4
11	1.63	1	4
12	18.37	1	4
13	10	0.16	4
14	10	1.84	4
15	10	1	0.65
16	10	1	7.35
17	10	1	4

Concentrações dos compostos em m/v.

## 2.4. Análise de imagem das superfícies dos filmes

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

Os métodos de captura e análise de imagem foram empregados como descrito por Yam e Papadakis (2003), envolvendo o registro por uma câmera digital e obtenção dos dados de distribuição das cores por coordenadas CIELab no software Adobe Photoshop® CS6. No modelo de análise CIELab, o parâmetro “a” representa uma tendência de coloração vermelha para valores positivos e verde para valores negativos. A partir da determinação dos valores de “a” para cada filme produzido, foi possível estabelecer uma relação entre a eficiência de extração dos pigmentos e a cor assumida pelos filmes, diante da intensidade de coloração vermelha apresentada. As medidas foram tomadas em sete pontos aleatórios das superfícies dos filmes.

### 2.5. Análises Estatísticas

Análises estatísticas foram realizadas para determinar diferenças significantes entre os valores do parâmetro “a” estabelecidos. Os dados foram processados pelo *software* Statistics 7.0® com análises de variância realizadas pelo método ANOVA seguido pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

### 3. Resultados e Discussão

No primeiro planejamento experimental estabelecido, apresentado na Tabela 1, embora todos os experimentos, após secagem, tenham apresentado uma coloração avermelhada, aquele que exibiu aspecto visual e textura mais próximos de um filme foi o de número 11. Este ensaio, que representava um dos pontos axiais do delineamento, no entanto, utilizou a solução polimérica de extrato com uma concentração de 4,9%, um valor distante daquele estabelecido por Fernandes (2018) como ótimo.

Diante disso, o teste CIELab foi aplicado para a determinação dos parâmetros “a” de cada ensaio, a fim de se estabelecer a tendência de exibição da coloração vermelha e, a partir de uma comparação entre os valores encontrados, definir se as diferentes concentrações de extração nas soluções de PEO interferiam na intensidade da cor vermelha para cada

experimento. A Tabela 3 apresenta os valores determinados para o parâmetro “a” de cada ensaio, tratados pelo método ANOVA seguido do teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Tabela 3 – Valores determinados para o parâmetro “a”.

Experimento	“a”
1	47,43 ± 0,57*
2	48,86 ± 1,37*
3	48,57 ± 0,95*
4	46,29 ± 0,68*
5	48,57 ± 0,90*
6	48,86 ± 0,77*
7	46,28 ± 0,92*
8	46,57 ± 0,65*
9	48,43 ± 0,97*
10	47,57 ± 0,84*
11	48,57 ± 0,61*
12	46,43 ± 0,65*
13	46,71 ± 1,48*
14	47,71 ± 0,75*
15	47,29 ± 0,42*
16	48,43 ± 0,61*
17	47,00 ± 1,29*

\*Valores com o mesmo sobrescrito indicam que não houve diferença significativa, de acordo com o Teste de Tukey.

As análises estatísticas mostraram que as características inerentes a cada experimento não influenciam de forma significativa nos valores dos parâmetros “a” determinados. A homogeneidade revelada pelo teste de Tukey para os experimentos realizados corrobora essa evidência. Assim, a solução polimérica de extrato, reagente que exerce maior influência na coloração final, apresenta uma forte tendência a exibir a coloração vermelha, mesmo em concentrações de extração mais baixas.

Considerando-se os resultados obtidos a partir do primeiro planejamento experimental, um segundo delineamento, apresentado na Tabela 2, foi realizado. Neste, as soluções de extrato foram preparadas com concentrações mais baixas de PEO, a fim de favorecer a formação dos filmes, visto que em um primeiro momento, o experimento que apresentou características visíveis e materiais mais próximas de um filme foi aquele com menor concentração de PEO. As concentrações de

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

glicerol também foram alteradas para uma melhor adequação aos novos experimentos.

Novamente, o teste CIELab foi aplicado e uma análise estatística realizada. Nesse caso, o teste de Tukey indicou que houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os valores de “a” estabelecidos para alguns experimentos, como se pode inferir pela Figura 1.

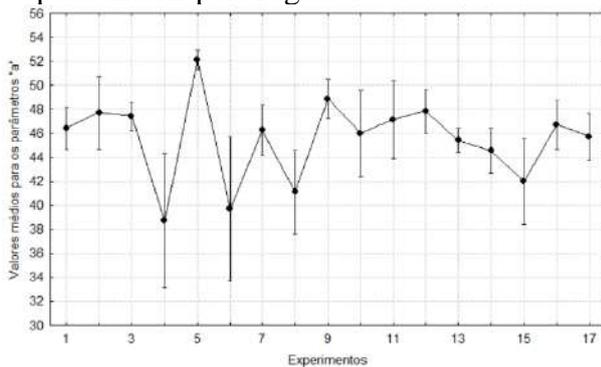


Figura 1 – Análise de diferenças significativas entre os experimentos pelo teste de Tukey.

Embora os experimentos 4, 5, 6, 8 e 15 tenham apresentado maior discrepância de valores de “a”, quando comparados aos demais, eles não apresentaram formação de filmes. Já os experimentos 2, 7 e 11, que não apresentaram diferenças significativas com os demais, de acordo com as análises estatísticas realizadas, exibiram boas características de formação de filmes, assim como boa intensidade de coloração vermelha, indicando potencial uso enquanto sensor colorimétrico para embalagens inteligentes.

## 5. Conclusões

As soluções poliméricas incorporadas com o pigmento antocianina não demonstraram discrepância de coloração avermelhada, independente das concentrações de PEO 1500 utilizadas. Diante da eficiência de extração observada para todas as concentrações testadas, através da análise colorimétrica, experimentos envolvendo concentrações poliméricas mais baixas, goma carboximetilcelulose e glicerol foram capazes de gerar filmes apresentando características aparentemente adequadas de estrutura e coloração, com potencial para atuação como sensor colorimétrico em embalagens inteligentes. Uma vez que as

antocianinas interagem bem com as moléculas liberadas na decomposição da carne suína, testes futuros poderão indicar a atuação desses filmes na detecção do estado de conservação desse alimento.

## 5. Referências Bibliográficas

DAVE, D.; GHALY, A. E. Meat spoilage mechanisms and preservation techniques: a critical review. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 6, p. 486-510, 2011.

FERNANDES, T. S. **Otimização da Extração de Antocianinas do Resíduo de Arroz Negro Utilizando Soluções Aquosas de Polímero**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto, p. 62, 2018.

KANG, J.; KIM, S.; KWON, Y. Antibody-based biosensors for environmental monitoring. **Toxicology Environment Health Science**, v. 1, p. 145-150, 2009.

MAHALIK, N. P. Processing and packaging automation systems: A review. **Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety**, v. 3, p. 12-25, 2009.

PARK, Y. et al. Application of biosensors in smart packaging. **Molecular and Cellular Toxicology**, v. 11, p. 277-285, 2015.

TOLDRÁ, F. **Meat Biotechnology**. 1. ed. Valencia: Springer, 2008.

XIAO-WEI, H. et al. Determination of pork spoilage by colorimetric gas sensor array based on natural pigments. **Journal of Food Chemistry**, v. 145, p. 549-554, 2014.

YAM, K. L.; PAPADAKIS, S. E. A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. **Journal of Food Engineering**, v. 61, p. 137-142, 2004.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

## DESENVOLVIMENTO DE REVESTIMENTOS DE QUITOSANA PARA A CONSERVAÇÃO PÓS-COLHEITA DE PÊSSEGO

Maia<sup>1</sup>, C. R. A. e Oliveira Júnior<sup>2</sup>, E. N.

<sup>1</sup>Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), *Campus* Alto Paraopeba (CAP), Engenharia de Bioprocessos, Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), *Campus* Alto Paraopeba (CAP), Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos (DQBIO), Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil.

E-mail: maiarcarla@gmail.com

### 1. Introdução

O pêsego se difundiu rapidamente pelo mundo e seu cultivo adaptou-se a uma grande variedade de situações climáticas. Os países maiores produtores de pêsego são China, seguido pela Espanha, Itália, Grécia e Estados Unidos (WORLD ATLAS, 2019).

A produção brasileira, que está presente há mais de 470 anos, encontrou nos Estados do Sul as melhores condições para a expansão (PÊSSEGO, 2008). Segundo o IBGE (2015), os principais estados produtores são: Rio Grande do Sul (59,6%), São Paulo (16,6%), Santa Catarina (10%), Minas Gerais (8,7%) e Paraná (4,9%).

O pêsego possui apenas uma safra por ano, com oferta nos meses de setembro a fevereiro e a produção é insuficiente para atender a demanda interna de consumo (MEDEIROS; RASEIRA, 1998). Sua fruta é delicada e exige a necessidade de mão-de-obra nas confecções do pomar e no processamento. Cada hectare de pessegueiro ocupa diretamente de uma a duas pessoas, durante todo o ciclo produtivo, nesse sentido, somente a produção primária gera 30 mil empregos diretos, além de mais de 50 mil para toda a cadeia produtiva. Nas indústrias que fabricam doces, geleias e pêsego seco, são empregados, de forma sazonal em torno de 2 mil pessoas (MADAIL, 2003).

Das plantas frutíferas cultivadas, o pessegueiro se destaca por ter as frutas mais

sensíveis ao manuseio, transporte e armazenamento, devido principalmente a características, como: a elevada desidratação, perda de firmeza da polpa e a incidência de fungos de armazenamento (SASAKI, 2009). Por isto, a colheita dos frutos é realizada no início da maturação, com objetivo de prolongar o período de armazenamento. Em consequência, a qualidade sensorial dos frutos é baixa quando estas amadurecem e a susceptibilidade a distúrbios fisiológicos e danos mecânicos aumenta (ROMBALDI et al., 2002; FERRER et al., 2005).

Nesse contexto, surge a necessidade de utilizar novas tecnologias com o objetivo de prolongar a vida útil desses frutos.

A quitosana é um dos polímeros mais cotados para essa aplicação, uma vez que ela é atóxica, biodegradável, apresenta capacidade de formar um recobrimento semipermeável, possui atividade antimicrobiana (LUVIELMO; LAMAS, 2012) e prolonga a vida pós-colheita, minimizando a taxa de respiração e reduzindo a perda d'água de frutos. Sua aplicação também justifica-se pelo baixo custo de produção, a qual é produzida a partir dos descartes do processamento de crustáceos. Portanto, o objetivo do trabalho foi monitorar pêsegos cv. 'Ouro Asteca' pós-colheita tratados com quitosana (1%) quanto aos parâmetros perda de massa, coloração e firmeza da polpa em condições ambientes e

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

comparar com os resultados de pêssegos não tratados (controle).

## 2. *Material e Métodos*

Os reagentes utilizados são do Laboratório de Processos Químicos do Programa de Pós-Graduação em Tecnologias da Universidade Federal de São João Del Rei, Campus Alto Paraopeba e apresentam grau analítico. A quitosana utilizada foi adquirida da Primex e foi diluída a 1% (m/v) em uma solução de ácido acético 1% (v/v) sob agitação a 25°C (Agitador magnético DT3120H, DiagTech) e deixada por 24 horas para a completa solubilização. Um total de 150 pêssegos foram lavados em água corrente, imersos em solução de hipoclorito de sódio 1% (v/v) por 5 minutos para desinfecção e lavados novamente com água e 75 frutos tratados foram imersos na solução de quitosana e os outros 75 frutos foram o tratamento controle (sem quitosana).

Para a análise de coloração, os frutos foram fotografados com uma câmera fotográfica (Smartphone Iphone SE) durante os dias de análise. Assim, foi determinado a coloração da casca com o auxílio do programa Adobe Photoshop TM. No sistema CIELAB foram obtidos os valores do componente vermelho-verde  $a^*$  (YAM; PAPADAKIS, 2004), o qual permite avaliar a mudança de coloração do fruto durante o amadurecimento.

A massa dos frutos foi obtida utilizando uma balança analítica (Balança analítica ED2245, Sartorius) e os resultados foram expressos em porcentagem. A firmeza foi determinada com o auxílio de um dinamômetro digital (Dinamômetro digital DD-2000, Instrutherm) e expressos em Newton.

Os sólidos solúveis, a acidez titulável e o pH de cada amostra foram determinados a partir de um filtrado obtido pela homogeneização de 10 g de polpa de pêssego em 100 mL de água com o auxílio de um mixer (Mixer inox, Britânia) e filtrado em papel filtro.

Os sólidos solúveis foram obtidos a partir da adição de 2 gotas do filtrado em um refratômetro portátil (Refratômetro portátil RTA-50, Instrutherm). O pH foi determinado utilizando um pHmetro (pHmetro de bancada digital DM-22, Digimed). A acidez titulável foi encontrada a partir de uma titulação de 100 mL do filtrado com NaOH 0,1 M até o ponto de viragem de cor (fenolftaleína), sendo expressa em termos da porcentagem de ácido málico de acordo com Brasil (1986) com adaptações.

Todos os parâmetros foram analisados por meio de análise de variância a 5% de probabilidade utilizando os testes de Fisher e de média de Tukey. O resultado de cada tratamento resultou da média de três repetições. Os valores de F de Fisher e as diferenças de médias ( $p \leq 0,05$ ) avaliadas pelo teste de Tukey foram calculados usando-se o software Origin.

## 3. *Resultados e Discussão*

A perda de massa foi crescente e linear durante os dias de análises, como mostrado na figura 1. Após 10 dias de armazenamento, a perda de massa dos frutos tratados com quitosana foi de  $41,28\% \pm 2,42\%$  e a perda de massa do controle de  $26,07\% \pm 4,31\%$ .

A quitosana possui habilidade de modificar a atmosfera interna e diminuir as perdas por transpiração e desidratação dos frutos como relatado por ElGhaouth al. (1991). Porém, ao contrário do que se esperava, ela não teve efeito protetor contra a perda de massa dos pêssegos cv. 'Ouro Asteca'. Os frutos tratados apresentaram a maior perda de massa, mostrando sinais visíveis de desidratação e comprometendo o aspecto externo do fruto.

É possível observar injúrias na casca dos frutos tratados em todos os dias de análises. Já nos frutos controle pode ser observado frutos com coloração mais verdes no dia 0 e frutos com coloração amarelada no dia 10, de acordo com o esperado. Além disso, os valores de luminosidade (L) foram maiores nos pêssegos

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

controle do que nos pêssegos tratados em todos os dias analisados, representando que a casca dos tratados estavam mais escuras do que a casca dos frutos.

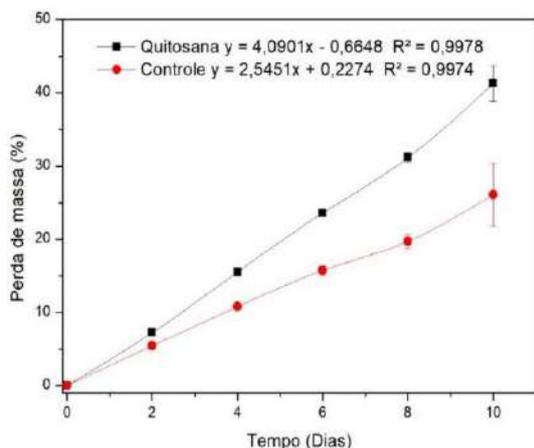


Figura 1: Perda de massa (%) nos pêssegos cv. 'Ouro Asteca' tratados e controles durante 10 dias.

A Figura 2 apresenta a evolução do amadurecimento dos pêssegos durante o período analisado.

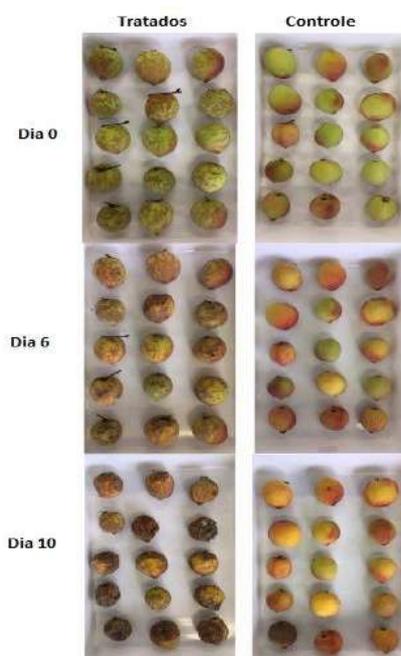


Figura 2: Evolução do amadurecimento dos pêssegos cv. 'Ouro Asteca' controle e tratados.

Na figura 3, observa-se a relação entre a firmeza (N) dos frutos tratados e controle em função do tempo de armazenamento e os

frutos controle apresentaram firmeza (N) de acordo com o esperado. As médias de firmeza realizadas para os frutos tratados apresentaram valores inferiores aos frutos controle durante os dias de armazenamento, comportamento contrário ao esperado. Esse efeito pode ser explicado pela maior perda de massa dos frutos tratados com quitosana comparados ao controle presente trabalho e menor turgidez refletindo na firmeza da polpa. Bron et al. (2002) também observaram acentuada queda da firmeza em pêssegos cv. "Dourado-2" tratados com quitosana a 1%.

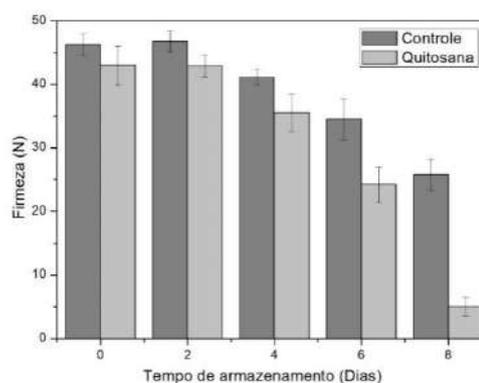


Figura 3: Firmeza (N) dos frutos cv. 'Ouro Asteca' controle e tratados durante o tempo.

Os teores de SST dos frutos tratados e controle não variaram significativamente durante o período de armazenamento, apresentando valores na faixa de 10° Brix, de acordo com Marodin (2008), que afirma que a cultivar "Ouro Asteca" possui 10,6° Brix. A acidez titulável dos pêssegos também não apresentou diferenças significativas durante o período de armazenamento e a relação sólidos solúveis/acidez apresentou valor menor que 25, sugeridos por Deshpandee Salunkle (1964) para os pêssegos com ótima maturidade para consumo. Já para o pH, os valores encontrados variaram de 3,54 a 3,82 para os frutos controle e de 3,57 a 4,04 para os tratados, estando de acordo com Teixeira (1979), que afirma que o pH em pêssegos varia de 3,2 a 4,7.

#### 4. Considerações Finais

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

O revestimento de quitosana provocou reação adversa e não aumentou a vida útil dos pêssegos cv. 'Ouro Asteca', havendo uma grande perda de massa e firmeza da polpa dos frutos e sinais visíveis de desidratação e ocorrência de podridão-parda. Pode-se concluir que apenas a higienização dos frutos com hipoclorito de sódio, prolongou a vida útil dos pêssegos em até de 10 dias e esse tratamento já seja suficiente para aumentar a vida útil de pêssegos.

### 5. Revisão bibliográfica

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 76 de 26 de novembro de 1986. Dispõe sobre os métodos analíticos de bebidas e vinagre. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 28 nov. 1986. Seção 1, pt. 2.

BRON, I.U.; JACOMINO, A.P.; APPEZATO-DA-GLÓRIA, B. **Alterações anatômicas e físico-químicas associadas ao armazenamento refrigerado de pêssegos 'Aurora-1' e 'Dourado-2'**. Pesquisa Agropecuária Brasileira. Brasília, v.37, n.10, p.1349-1358, 2002.

DESHPANDE, P.B.; SALUNKHE, D.K. Effectsofmaturityandstorageoncertainbiochemi calchanges in apricotandpeaches. **Food Technology**, v.18, n.8, p. 85-88, 1964.

EL GHAOUT H, A.; ARUL, J.; PONNAMPALAM, R.; BOULET, M. Chitosancoatingeffectonstorabilityandqualityof freshstrawberries. **Journalof Food Science**, v.56, p. 1618-1620, 1991.

FERRER, A. et al. Changesduringtheripeningofthevery late season Spanish peach cultivar 'Calanda' Feasibilityofusing CIELAB coordinates as maturityindices. **ScientiaHorticulturae**, v.105, n.4, p.435-446, 2005.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas, 2015, "Indicadores IBGE, Estatística da Produção agrícola", Disponível em [tp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Fascic](http://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Fascic)

ulo\_Indicadores\_IBGE/estProdAgr\_201504.pdf > Acesso em: 09 de novembro de 2018.

LUVIELMO, M. M. LAMAS, S. V. **Revestimentos comestíveis em frutas**. Estudos tecnológicos em engenharia, v.8, n.1, p. 8-15, janeiro-junho. 2012.

MADAIL, J.C.M. Aspectos socioeconômicos. In: CASTRO, L.A.S. (Ed.). Ameixa: produção. Pelotas: Embrapa Clima Temperado; Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p. 13-15.

MARODIN, G.A.B.; PEREIRA DIAS, F.; CASTRO, B.; ARGENTA, F. **Comportamento de algumas cultivares de pêssegos na depressão central do Rio Grande do Sul** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 20., 2007.

MEDEIROS, C.A.B.; RASEIRA, M. do C.; **A Cultura do pessegueiro**; Embrapa – SPI; Brasília; 350p, 1998.

PÊSSEGO. Agriannual, São Paulo, p. 452–457, 2008.

ROMBALDI, C.V. et al. Armazenamento de pêssegos (*Prunuspersica* L.), cultivar Chiripá, em atmosfera controlada. **Ciência Rural**, v.32, n.1, p.43-47, 2002.

SASAKI, F.F., **Tratamentos térmicos, cloreto de cálcio e atmosfera modificada em pêssegos 'IAC Douradão': aspectos fisiológicos, bioquímicos e de qualidade**, (Tese), Universidade de São Paulo, Piracicaba, p. 178, 2009.

WORLD ATLAS, 2019. "Where do peaches grow?", Disponível em <https://www.worldatlas.com/articles/world-s-top-peach-producing-countries.html> Acesso em: 02 de setembro de 2019.

YAM, K. L. PAPADAKIS, S. E. A simple digital imagingmethod for measuringandanalyzing color offoodsurfaces. **Journalof Food Engineering**. v. 61, p. 137 – 142, 2004.

## PRODUÇÃO DE FILMES COM ADIÇÃO DE NANOQUITOSANA PARA A PRESERVAÇÃO DA GOIABA NO PÓS-COLHEITA

Campos<sup>1</sup>, C. H. S. R.; Fernandes<sup>1</sup>, L. P.; Coimbra, J. S. R.<sup>2</sup>; Oliveira, E.N.<sup>1</sup>; Santos<sup>1</sup>, I. J. B.

<sup>1</sup>Universidade Federal de São João del Rei, Campus Alto Paraopeba, DQBIO/Engenharia de Bioprocessos

<sup>2</sup>Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Tecnologia em Alimentos.

E-mail: chsrc22@gmail.com; lelepersilva@gmail.com

### 1. Introdução

O Brasil é o maior produtor de goiaba vermelha no mundo, porém a taxa de exportação do fruto “in natura” é inexpressiva pelo fruto possuir alta perecibilidade, necessidade de um rigoroso tratamento fitossanitário, um acondicionamento adequado e utilização do transporte aéreo para a distribuição internacional, onerando o valor da goiaba (FERRAZ, 2010; SEBRAE, 2016).

As embalagens nanotecnológicas surgem como uma alternativa promissora de aumentar a vida útil dos frutos (SIEGRIST et al., 2008). Uma das nanoestruturas que podem ser incorporadas nas embalagens é a quitosana por ser um biopolímero atóxico, biodegradável, capaz de formar filme, possuir atividade antimicrobiana, além de ser um biopolímero reconhecido como seguro pelo GRAS (Generally Recognized as safe) (AZEREDO, 2013).

Dessa forma, o objetivo desse trabalho é produzir filmes de goma tara com nanoestruturas de quitosana para futura aplicação na conservação da goiaba pós colheita.

### 2. Materiais e métodos

#### 2.1.1. Quitosana

A quitosana foi cedida pela empresa PRIMEX, lote TM3425, viscosidade 463cP,

grau de acetilação 8% e massa molar viscosimétrica 74.865, 25 g.mol<sup>-1</sup>.

#### 2.1.2. Obtenção da nanoestrutura

A nanoestrutura de quitosana (NQ) foi obtida de acordo com Calvo et al (1997) e Vimal et al (2012) com algumas modificações. Uma solução de 25,0 mL com concentração de 1,5 mg·mL<sup>-1</sup> de quitosana foi dissolvida em ácido acético 2,5 mg·mL<sup>-1</sup> sob agitação 500 rpm a 25°C por 24h. Então, 6,0 mL de uma solução de 2,0 mg·mL<sup>-1</sup> de tripolifosfato de sódio foi gotejada com uma pipeta de 1,00 mL, em uma vazão de 1,00 mL·min<sup>-1</sup>, em 21,00 mL de solução de quitosana sob agitação 2500 rpm a 25°C. Após a formação da nanoestrutura, a solução foi armazenada a 4°C.

#### 2.1. Obtenção de filmes de goma tara com nanoestruturas incorporadas

Suspensões de nanopartículas nas concentrações de 0, 1, 3 e 5% m/m foram adicionadas em soluções de goma tara a 1,0% m/v. A solução de goma foi preparada a 25°C sob agitação por 2h. Glicerol a 20,0% m/v e ácido acético na concentração final de 0,42 % v/v foram adicionados. As soluções foram colocadas em um banho ultrassônico. Após o banho ultrassônico, 90,0 mL de solução foi vertida em um vidro (15 x 20 cm) e seco a 40° C por 24h. O filme obtido foi armazenado a 53% de umidade relativa a 25°C por 5 dias na BOD.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

**2.1.1. Espessura do filme**

Dez pontos diferentes e aleatórios da espessura do filme foram medidos com micrômetro (Mitutoyo Mfg. Co. Ltda., Kawasakishi, Kanagawa, Japão). Após essas medições foram calculadas as médias dos resultados obtidos.

**2.1.2. Gramatura**

Os filmes foram cortados em quadrados de 2 x 2 cm e pesados em uma balança analítica (Balança Analítica AY 220, Shimadzu Corporation). As massas obtidas foram divididas pela área e, assim, obteve-se a gramatura  $g \times m^{-2}$  e o resultado em triplicata.

**2.1.3. Teste de teor de umidade**

Os filmes cortados em 2,0 x 2,0cm, triplicata, foram pesados na balança analítica, secos a 100°C na estufa (Estufa Bacteriológica Solab Científica) por 24h e pesados novamente. Calculou-se o teor de umidade a partir da massa final e a massa inicial em porcentagem.

**2.1.4. Teste de solubilidade**

Os filmes cortados em 2,0 x 2,0cm, triplicata, foram pesados na balança analítica e mergulhados em 30,0 mL de água destilada sob agitação por 24h. Depois das 24h foram secos a 60°C na estufa e novamente pesados. A solubilidade foi obtida a partir da massa inicial e a final do filme em porcentagem.

**2.1.5. Permeabilidade ao vapor de água**

Os filmes foram cortados 4,0 x 4,0 cm, pesados na balança analítica juntamente com 10,0000 g de sílica gel azul, colocadas dentro dos frascos, sendo fechadas pelos filmes cortados. Dentro de um dessecador foram colocados os frascos e 200,0 mL de uma solução de salina de cloreto de sódio a 10% (m/v). Todos os parâmetros (umidade e temperatura) foram controlados a partir de um higrômetro e o dessecador ficou dentro da BOD a 25°C e 77% de umidade. Os frascos foram pesados de manhã, a tarde e à noite até que as massas se estabilizassem.

**2.2. Análise estatística**

Os resultados foram analisados pelo teste de Tukey no software Statistica versão 10.0 com 5% de significância.

**3. Resultados e discussão**

**3.1. Análises dos filmes de goma tara incorporados ou não com NQ**

**3.1.1. Espessura e Gramatura**

Os resultados de espessura e gramatura da caracterização do filme de GT incorporado com NQ foram apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Valores de espessura e gramatura para filmes com diferentes concentrações de NQ

Filme	Espessura ( $\mu m$ )	Gramatura ( $g \times m^{-2}$ )
Controle	49,579 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>	84,208 $\pm$ 12,034 <sup>c</sup>
1% de NQ	49,233 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	45,000 $\pm$ 5,680 <sup>a</sup>
3% de NQ	43,400 $\pm$ 0,004 <sup>b</sup>	49,333 $\pm$ 2,039 <sup>a</sup>
5% de NQ	47,200 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	37,148 $\pm$ 4,298 <sup>b</sup>

<sup>a-c</sup> Médias na mesma coluna com diferentes sobrescritos diferem significativamente a  $p \leq 0,05$  de acordo com o teste de Tukey.

Os valores de espessura obtidos nos experimentos foram de 43,400 a 49,579  $\mu m$ . Houve diferença significativa no filme com 3% de nanoestrutura de quitosana. O com tratamento de 3% diminuiu a espessura sugerindo o preenchimento com as NQ dos poros existentes no filme causando a compactação da estrutura do filme. Já o aumento da espessura do filme que ocorreu com a concentração de 5% de NQ, justifica-se, possivelmente, pelos poros da matriz já terem sido preenchidos e, dessa maneira, ocorreu um acúmulo de NQ na superfície.

A adição de nanoestruturas de quitosana fizeram com que os valores de gramatura diminuíssem, indicando que ao adicionar nanoestruturas ao filme elas modificaram a estrutura do polímero, criando um aumento do diâmetro da malha e, conseqüentemente, aumentando a área e devido a isso, houve um decréscimo da gramatura.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

### 3.1.2. Teor de umidade e Solubilidade

Os resultados obtidos de solubilidade e teor de umidade são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2- Valores de solubilidade e teor de umidade de diferentes filmes com diferentes concentrações de nanoestrutura de quitosana.

Filme	Solubilidade (%)	Umidade (%)
Controle	92,049 ± 2,499 <sup>a</sup>	35,405 ± 6,659 <sup>a</sup>
1% de NQ	90,332 ± 2,855 <sup>a</sup>	21,022 ± 1,096 <sup>b</sup>
3% de NQ	91,005 ± 1,336 <sup>a</sup>	16,321 ± 3,951 <sup>b</sup>
5% de NQ	86,574 ± 6,319 <sup>a</sup>	16,916 ± 3,906 <sup>b</sup>

<sup>a-b</sup> Médias na mesma coluna com diferentes sobrescritos diferem significativamente a  $p \leq 0,05$  de acordo com o teste de Tukey.

O teor de umidade variou de 16,321 a 35,405% e houve diferença significativa entre os filmes tratados e o controle. Pode-se concluir que o teor de umidade diminui conforme o aumento da concentração de nanoestrutura, indicando que as nanoestruturas de quitosana compactam a matriz do filme.

As moléculas do polímero possuem preferência em ligar nas moléculas de NQ do que nas moléculas de água. Antoniou et al. (2015), obteve resultado em que a umidade diminuiu ao adicionar NQ em concentrações de 5, 10 e 15% em filmes de goma tara variando os valores de 11,26 a 14,50%.

Os valores de porcentagem da solubilidade variaram de 86,574 a 92,591%, demonstrando que os filmes são solúveis em água.

### 3.1.3. Permeabilidade ao vapor de água

Os resultados de permeabilidade ao vapor de água e a taxa de permeabilidade ao vapor de água se encontram na Tabela 3.

Tabela 3- Valores de permeabilidade ao vapor de água e a taxa de permeabilidade ao vapor de água de diferentes filmes com diferentes concentrações de nanoestrutura de quitosana.

Filme	Permeabilidade ao vapor d'água (g x mm x m-2 x dia-1 x mmHg-1)	Taxa da permeabilidade ao vapor de água (g x m-2 x dia-1)
Controle	145,764 ± 12,627 <sup>ab</sup>	71,917 ± 1,00 <sup>a</sup>
1% de NQ	128,076 ± 12,416 <sup>a</sup>	62,938 ± 5,65 <sup>a</sup>
3% de NQ	169,888 ± 7,016 <sup>bc</sup>	96,167 ± 4,35 <sup>b</sup>
5% de NQ	181,895 ± 13,692 <sup>c</sup>	94,375 ± 5,32 <sup>b</sup>

<sup>a-b</sup> Médias na mesma coluna com diferentes sobrescritos diferem significativamente a  $p \leq 0,05$  de acordo com o teste de Tukey.

Os valores da permeabilidade ao vapor d'água e da taxa de permeabilidade ao vapor d'água (TPVA) que variaram de 128,0759 a 181,8953g x mm x m-2 x dia-1 x mmHg -1 e 62,9375 a 96,1667g x m2 x dia-1, respectivamente. Os filmes com adição de 1% de NQ houve redução da PVA em comparação aos outros tratamentos e pode ser justificado devido ao preenchimento dos poros da matriz pela NQ e, assim, dificultando a passagem de molécula de água pelo filme. Segundo, Chang et al. (2010), ao adicionar nanoestruturas, as moléculas de água encontram dificuldades em passar pela matriz polimérica, e assim, aumenta o caminho tortuoso do vapor de água para percorrer. A transferência de vapor de água geralmente ocorre através da porção hidrofílica do filme, dessa maneira, a TPVA depende da relação de componentes hidrofílicos-hidrofóbicos dos filmes (GARCIA; MARTINO; ZARITZKY, 2000). Observou-se que a adição de NQ diminuiu a TPVA, porém o filme com 1% de NQ não obteve diferença significativa com o controle.

## 4. Conclusão

Foi possível obter filmes de goma tara com nanoestruturas de quitosana incorporadas que apresentaram propriedades diferentes do filme

11 a 13 de setembro de 2019

Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

sem adição de nanoestruturas. Diferenças essas nas propriedades de resistência e de barreira do filme, compactação da matriz do filme, tornando-o menos úmido, ou ainda alterando a passagem de água pelo filme. Com isso, os filmes com nanoestrutura de quitosana apresentaram-se promissores para aplicações futuras em frutos pós colheita.

### 5. *Agradecimentos*

Os autores agradecem ao CNPq pelo apoio financeiro, ao laboratório multiusário CiPharma da UFOP pelas medidas em NanoZeta Sizer, ao projeto “Asymmetric Flow Field Flow Fractionation” (FAPEMIG CDS – APQ 01510-14) e ao Centro de Microscopia e Microanálises (MMC) da UFV.

### 6. *Referências Bibliográficas*

AZEREDO, H. (2013). Antimicrobial nanostructures in food packaging. Trends in Food Science & Technology, 30(1), pp.56-69.

ANTONIOU, J.; LIU, F.; MAJEED, H.; ZHONG, F., Characterization of tara gum edible films incorporated with bulk chitosan and chitosan nanoparticles: A comparative study. Food Hydrocolloids 2015, 44, 309-319.

CALVO, P.; REMUNAN-LOPEZ, C.; VILA-JATO, J.; ALONSO, M., Novel hydrophilic chitosanpolyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. Journal of Applied Polymer Science 1997, 63 (1), 125-132.

CHANG, P. R.; JIAN, R; YU, J; MA, X. “Fabrication and characterisation of chitosan nanoparticles/plasticized – starch composites”. Food Chem., 120: 736, 2010.

GARCIA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Lipid addition to improve barrier properties of edible starch-based films and coatings. Journal of food science, v. 65, n. 6, p. 941-944, 2000.

FERRAZ, D. M. M. Controle da antracnose (*Colletotrichum*

*gloeosporioides*) em pós-colheita de goiaba (*Psidium guajava*), produzida em sistema de cultivo convencional orgânico, pela aplicação de fosfitos, hidrotermia e cloreto de cálcio. 2010. 119 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

SEBRAE. O cultivo e o mercado da goiaba. 2016. Disponível em: <https://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/o-cultivo-e-o-mercado-da-goiaba,d3aa9e665b182410VgnVCM100000b272010aRCRD>. Acesso em: 12 de maio de 2019.

SIEGRIST, M., STAMPFLI, N., KASTENHOLZ, H., & KELLER, C. (2008). Perceived risks and perceived benefits of different nanotechnology foods and nanotechnology food packaging. *Appetite*, 51(2), 283–290. doi:10.1016/j.appet.2008.02.020

VIMAL, S.; TAJU, G.; NAMBI, K. S. N.; ABDUL MAJEED, S.; SARATH BABU, V.; RAVI, M.; SAHUL HAMEED, A. S., Synthesis and characterization of CS/TPP nanoparticles for oral delivery of gene in fish. *Aquaculture* 2012, 358–359, 14-22.

## MODELAGEM E SIMULAÇÃO DO CRESCIMENTO DA MICROALGA *Chlorella vulgaris* EM FOTOBIOREATOR

GOULART<sup>1</sup>, C. M.; LIMA<sup>2</sup>, H. S. V.; LOPES<sup>3</sup>.L. C. e LOURENÇO<sup>4</sup>, R. O.

<sup>1</sup> Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), Departamento de Engenharia Química/ Engenharia Química

<sup>2</sup> Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), Departamento de Engenharia Química/ Engenharia Química

<sup>3</sup> Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), Departamento de Engenharia Química/ Engenharia Química

<sup>4</sup> Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), Departamento de Engenharia Química/ Engenharia Química

camilamougouart@gmail.com<sup>1</sup>  
henriquevianaeq@gmail.com<sup>2</sup>  
leilalopes95.ll@gmail.com<sup>3</sup>  
reimar@ufsj.edu.br<sup>4</sup>

---

### 1. Introdução

As microalgas são utilizadas em diversas aplicações humanas por serem altamente adaptáveis às condições físico-químicas diferentes e requerem menos água do que outras culturas (TANDON; JIN, 2017).

Ademais, podem ser obtidos também biocombustíveis de alto valor agregado como biodiesel, etanol e metano. Uma das grandes vantagens do cultivo de microalgas é a capacidade de ocupar uma área inferior a outros cultivos tradicionais (CHISTI, 2008).

Verificou-se que para cultivar microalgas em larga escala é necessário modelar o crescimento, de modo a controlar a composição do meio de cultura, especificamente fontes de carbono, nitrogênio e fósforo, além de manter o pH e a temperatura com baixas oscilações.

Diversos modelos matemáticos têm sido propostos na literatura, com destaque para o trabalho de CONCAS et al. (2012), que analisou o processo em um reator semi-batelada alimentado com CO<sub>2</sub> puro (100% v/v).

STRAKA e RITTMANNA (2018) avaliaram o desenvolvimento de microalgas em função da luminosidade, visto que uma alta intensidade luminosa leva a altas taxas de multiplicação das células, em contrapartida isso pode ocasionar um fotoenvelhecimento com um declínio temporário na curva de crescimento. Por fim, foi observado que a incidência de luz no reator decaiu com o aumento da biomassa.

Nesse cenário, o presente trabalho consiste no desenvolvimento de um modelo matemático simples e robusto para o crescimento da-

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

microalga *Chlorella vulgaris* em fotobiorreator operando semi-batelada, com injeção contínua de CO<sub>2</sub> puro, 100% v/v.

### 2. Material e Métodos

A modelagem adotada considera o volume de controle um fotobiorreator representado pela Figura 1.

As considerações do modelo são reator operando em semi-batelada, injeção de gás é contínuo com CO<sub>2</sub> puro, 100% v/v, pressão e temperatura constantes, gás comporta-se como ideal, interface gás-líquido não oferece resistência à transferência de massa, não há resistência à transferência na fase gasosa, não há gradiente de concentração, devido a agitação do meio de cultura pelo impelidor.

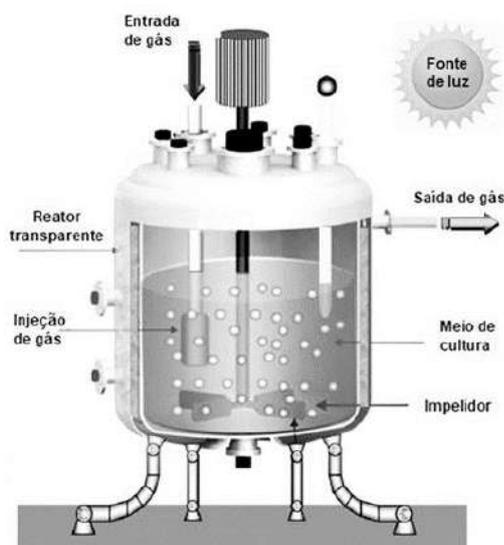


Figura 1- Representação esquemática do fotobiorreator usado para cultivo da microalga *Chlorella vulgaris*

As dimensões do fotobiorreator representado pela Figura 1, são 5 cm de diâmetro, 25 cm de altura, portanto uma capacidade de 1,5 L. É assumido que o mesmo foi preenchido com 1,0 L de meio de cultura, mantido a temperatura de 25°C.

### 2.1. Balanço de Massa

A análise considera o meio de cultura como volume de controle e aplica a Primeira Lei de Conservação de Massa. Substituindo o componente A pelo carbono e oxigênio e com as manipulações matemáticas necessárias, tem-se as Equações 1 e 2.

$$\frac{d[C_{tot,l}]}{dt} = \frac{V_R}{V_l} k_{l,CO_2} a_v (H_{E,CO_2} [CO_{2,g}] - [CO_{2,l}]) - Y_{C,tot} \mu_x [X] \quad (1)$$

$$\frac{d[O_{2,l}]}{dt} = \frac{V_R}{V_l} k_{l,O_2}^0 a_v (H_{E,O_2} [O_{2,g}] - [O_{2,l}]) + Y_{C,tot} \mu_x [X] \quad (2)$$

Em que  $[C_{tot,l}] = [C_{tot,l}^0]$  e  $[O_{2,l}] = [O_{2,l}^0]$  para  $t=0$ . Onde  $C$  concentração,  $V$  volume,  $a_v$  é a área interfacial de transferência de massa gás-líquido,  $H_{E,j}$  é a constante de Henry para equilíbrio gás-líquido,  $k$  é o coeficiente de transferência de massa gás-líquido,  $Y_j$  coeficiente de remoção do componente  $j$  ou seja conversão de substrato em biomassa ou metabólitos,  $\mu_x$  é a taxa específica de crescimento da microalga,  $X$  concentração de microalgas. Assim,  $t=0$ , a fase gasosa é constituída por oxigênio a 1 atm e 25°C em uma concentração 8,6 mol m<sup>-3</sup>, de acordo com a Lei dos Gases Ideais.

Para os demais componentes do meio de cultura, não há transferência de massa entre as fases, dessa forma, o balanço de massa para nutriente genérico  $w$  se restringe apenas ao consumo.

$$\frac{d[w_{tot,l}]}{dt} = -Y_{C,tot} \mu_x [X] \quad (3)$$

As condições iniciais para os nutrientes são  $[w_{tot,l}] = [w_{tot,l}^0]$  onde  $w = N, P, S, Cl, Mg, Ca, Na$  e  $K$ .

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

### 2.2. Concentração de Biomassa

O modelo de Monod é uma descrição clássica e amplamente empregada para representar a velocidade de crescimento das microalgas.

Várias alterações foram realizadas a fim de se considerar a influência de múltiplos nutrientes limitantes e outros fatores significativos para o crescimento como luminosidade e pH.

GRIMA et al. (1994) contemplou em sua adaptação a influência da luminosidade, avaliando a distribuição heterogênea da luz no interior do biorreator e o decaimento da incidência de fótons com o aumento de biomassa. MAYO (1997) avaliou a interferência do pH e da temperatura, simultaneamente, na taxa de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* em uma ampla faixa de variação. Dessa forma, o modelo adotado nesse trabalho para o parâmetro cinético de crescimento é descrito pela Equação 4.

$$\mu_x = \mu_0(pH) \frac{I_{av}^n}{I_K^n + I_{av}^n} \prod_{w=1}^{N_S} \frac{[W_{tot,l}]}{\lambda_{w,S} + [W_{tot,l}]} \quad (4)$$

Onde  $\mu_0(pH)$  é a taxa específica de crescimento dependente do pH,  $I_{av}^n$  é radiação solar média no meio de cultivo microalgal,  $I_K^n$  é o parâmetro de afinidade da microalga com a radiação solar e  $\lambda_{w,S}$  é a constante de meia saturação para o nutriente  $w$ .

### 3. Resultados e Discussão

Adotando as análises necessárias e considerações presente, neste estudo foi efetuada buscas na literatura, a fim de obter valores para os parâmetros este são exibidos na Tabela 1.

Tabela 1 - Condições iniciais do meio de cultura

Parâmetro	Concentração (mol m <sup>-3</sup> )
Biomassa (X <sup>0</sup> )	1,31 × 10 <sup>-3</sup>
Carbono (C <sup>0</sup> )	11,90
Nitrogênio (N <sup>0</sup> )	24,73
Fósforo (P <sup>0</sup> )	3,16
Enxofre (S <sup>0</sup> )	2,19

Cloro (Cl <sup>0</sup> )	15,21
Magnésio (Mg <sup>0</sup> )	1,01
Cálcio (Ca <sup>0</sup> )	0,27
Sódio (Na <sup>0</sup> )	13,81
Potássio (K <sup>0</sup> )	28,40

A simulação numérica do modelo foi realizada no software Scilab®, por meio da solução de um sistema de equações diferenciais ordinárias, utilizando o método de *Runge-Kutta de quarta ordem* para um problema de valor inicial, com auxílio da interface de vários solucionadores, em particular *ODEPACK*, aplicando também uma abordagem híbrida do método de *powell* para resolução de uma equação não linear por meio da função *fsolve*, disponíveis na biblioteca do programa.

O crescimento da microalga determinado pelo modelo, exibido pela Figura 2.

A análise da Figura 2 permite identificar a fase exponencial no intervalo de tempo de 0 a 380 horas, seguida da desaceleração do crescimento, entre 380 e 720 horas, e por fim a fase estacionária. O modelo de Monod, não contempla fase lag, ou seja, aquela em que os microrganismos estão adaptando-se as condições do meio e dessa forma, o crescimento é suave (MERCHUCK; ASENJO, 1994). Por isso, a simulação já tem início na fase exponencial.

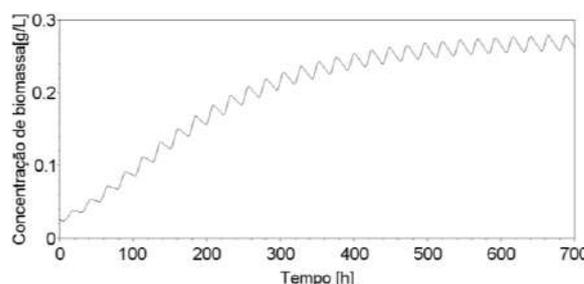


Figura 2 - Crescimento de microalgas em função do tempo considerando C<sup>0</sup> = 11,90 mol m<sup>-3</sup>, N<sup>0</sup> = 24,73 mol m<sup>-3</sup> e P<sup>0</sup> = 3,67 mol m<sup>-3</sup>

A partir do modelo foi observado que a assimilação de nitrogênio e fósforo, foram de

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

41,32% v/v e 22,27% v/v, respectivamente, assim o nitrogênio tem uma assimilação maior, visto que o coeficiente de meia saturação e remoção são menores para o fósforo.

SUTHAR et al. (2018) ao analisar as condições ótimas para crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* observou que em concentrações superiores a  $200 \text{ mg L}^{-1}$  que a capacidade de absorção pelas células é reduzida em 50%, assim como há um decaimento na densidade de biomassa no meio. As absorções para os demais nutrientes foram baixas, sendo a maior para o cálcio com cerca de 28,37% v/v e menor para o cloro de 0,13% v/v, o que era esperado já que as células necessitam de menores quantidades para realizar suas atividades metabólicas (HISS, 2013).

Para concentrações superiores àquelas adotadas na Tabela 1, o comportamento das curvas de crescimento de microalgas em função do tempo, variando as concentrações dos compostos é equivalente. Esse cenário é justificado pela constante de meia saturação, cujo valor representa a metade da velocidade no instante em que a concentração de substrato é máxima. Logo esse valor foi estabelecido para a concentração de  $C^0 = 11.90 \text{ mol m}^{-3}$ ,  $N^0 = 24.73 \text{ mol m}^{-3}$  e  $P^0 = 3.67 \text{ mol m}^{-3}$ . Com o aumento da concentração desses componentes no meio, não haverá um acréscimo na taxa específica de crescimento e consequentemente,  $\mu_x$  será igualado a  $\mu_{max}$ . O modelo é limitado por não considerar a inibição do crescimento pela alta concentração de nutrientes, pois meios de cultura com elevadas quantidades de nitrato provocam um estresse metabólico na célula, reduzindo o crescimento da biomassa (SUTHAR et al., 2018).

#### 4. Conclusão

A biomassa máxima encontrada no modelo para cultivo de microalga no fotobiorreator foi de  $0,28 \text{ g L}^{-1}$ , considerando o fotoperíodo de 12 horas e agitação contínua. Os resultados e

gráficos obtidos mostraram-se condizentes com as análises experimentais desenvolvidas por outros autores sendo um bom indício de que o modelo desenvolvido é capaz de descrever quantitativamente o efeito das variáveis analisadas no crescimento da microalga.

#### 5. Referências Bibliográficas

CHISTI, Y. Response to Reijnders: Do biofuels from microalgae beat biofuels from terrestrial plants? **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 7, p. 351-352, 2008.

CONCAS, A.; LUTZU, G. A.; PISU, M.; CAO, G. Experimental analysis and novel modeling of semi-batch photobioreactors operated with *Chlorella vulgaris* and fed with 100% (v/v) CO<sub>2</sub>. **Chemical Engineering Journal**, v. 213, p. 203-213, 2012.

GRIMA, E. M.; CAMACHO, F. G.; PÉREZ, J. A. S.; SEVILLA, J. M. F.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; GÓMEZ, A. C. A mathematical model of microalgal growth in light limited chemostat cultures. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 61, p. 167-173, 1994.

HISS, H. **Cinética de Fermentações: Uma análise matemática da atividade microbiana**. 1. ed. São Paulo: [ ], 2013.

MAYO, A. W. Effects of Temperature and pH on the Kinetic Growth of Unialga *Chlorella vulgaris* Cultures Containing Bacteria. **Water Environment Research**, v. 69, n. 1, p. 64-72, Jan./Feb., 1997.

MERCHUCK, J. C.; ASENJOT, J. A. The Monod Equation and Mass Transfer. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 45, p. 91-94, 1994.

STRAKA, L.; RITTMANN, B. E. Light-dependent kinetic model for microalgae experiencing photoacclimation, photodamage, and photodamage repair. **Algal Research**, v. 31, p. 232-238, Apr. 2018.

SUTHAR, S.; VERMA, R.; KUMAR, K. Production of *Chlorella vulgaris* under varying nutrient and abiotic conditions: A potential microalga for bioenergy feedstock. **Process Safety and Environment Protection**, v. 113, p. 141-148, Jan. 2018.

TANDON, P.; JIN, Q. Microalgae culture enhancement through key microbial approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 80, p. 1089-1099, Dec. 2017.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

## PRODUÇÃO DE MANGANÊS PEROXIDASE A PARTIR DO *CERIPORIOPSIS SUBVERMISPORA*

Maciel<sup>1</sup>, G. M.; Dias<sup>2</sup>, S. C.

<sup>1</sup> Universidade Federal de São João Del Rei, DEQUI

<sup>2</sup> Universidade Federal de São João Del Rei, DQBIO

E-mail: gabrimmaciel@gmail.com

### 1. Introdução

Os fungos da podridão branca produzem uma gama de enzimas capazes de mineralizar a lignina. *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Ganoderma lucidum* e *Ceriporiopsis subvermispورا* são algumas espécies deste grupo. *C.subvermispورا* pertence a família Polyporaceae, sendo encontrado em regiões temperadas, como sul do Canadá, norte da América do Norte e Europa Central [1].

O sistema enzimático dos fungos da degradação branca é constituído por enzimas extracelulares, as oxidoredutases. Estas enzimas atuam especificamente sobre a estrutura complexa e variável da lignina, e de forma inespecífica sobre xenobióticos aromáticos, como corantes, herbicidas e alguns fármacos [2].

Lacase (Lac), manganês peroxidase (MnP), lignina peroxidase (LiP) e a peroxidase versátil (Pv) são as principais enzimas lignolíticas produzidas pelo *C. subvermispورا* [3]. Destas manganês peroxidase e lacase são extensivamente estudadas [4-6].

Manganês peroxidases (E.C. 1.11.1.13) são proteínas extracelulares, glicosiladas, massa molar de 45 a 47 kDa e possuem grupo prostético heme [7]. A MnP oxida  $Mn^{2+}$  a  $Mn^{3+}$ , o  $Mn^{3+}$  é altamente reativo, e oxida estruturas fenólicas [8].

A produção das enzimas lignolíticas é regulada por fatores nutricionais, como tipo e

concentração da fonte de nitrogênio e de carbono, presença de indutores ( $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ) fatores ambientais, como temperatura, pH, cultivo estático ou agitado podem favorecer ou inibir a expressão das enzimas lignolíticas [8].

Manganês peroxidase tem aplicações na indústria de alimentos para produção de aromas naturais. Na indústria de biopolpação, o pré tratamento com MnP reduz o gasto energético no processo mecânico. Ela também pode ser empregada em processos de biorremediação para biodegradar corantes têxteis. Devido a sua propriedade de transferir elétrons, esta enzima pode ser utilizada em biosensores e células de bioenergia [9].

O objetivo deste trabalho foi investigar a influência de nutrientes na produção da MnP pelo *C. subvermispورا* utilizando o planejamento experimental *Plackett-Burman*.

### 2. Materiais e métodos

#### 2.1. Manutenção do microorganismo

O fungo *Ceriporiopsis subvermispورا*, cepa L1487 – SS3 foi repicado em placas de petri, contendo o meio de manutenção (extrato de malte 20 g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 2 g.L<sup>-1</sup> e ágar 20 g.L<sup>-1</sup>). As placas foram incubadas a 30°C, durante 7 dias e armazenadas a 4°C durante 15 dias [10].

#### 2.2. Inóculo

Discos de 1,6 cm de diâmetro foram removidos da placa da incubação e transferidos

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

para erlenmeyer contendo 50 mL do meio basal (extrato de malte 20 g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 2 g.L<sup>-1</sup> e dextrose 1 g.L<sup>-1</sup>, pH 4,5), e incubado a 30°C, 150 rpm durante 13 dias. Decorrido o tempo de incubação, as células foram recuperadas e transferidas para tubos cônicos de 50 mL contendo 30% de seu volume preenchido por esferas de vidro e água destilada estéril. Os tubos foram agitados no vórtex três vezes de 15 segundos, cada. A concentração de células e esporos foi determinada utilizando a equação 1.

$$\text{Concentração (mg. ml}^{-1}\text{)} = \frac{[\text{massa filtro} + \text{células(mg)}] - [\text{massa filtro (mg)}]}{\text{volume suspensão celular (mL)}} \quad (1)$$

### 2.3. Produção de Manganês Peroxidase

O planejamento estatístico *Plackett-Burman* (PB) foi utilizado para avaliar a influência de 11 variáveis, 5 fontes de carbono (acetato de sódio, óleo de soja, glicerol, farelo de trigo, glicose), três fontes de nitrogênio (peptona, nitrato de amônio e uréia) e 3 indutores (sulfato de manganês, tween 80 e ácido acético), tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Variáveis utilizadas durante o experimento *Plackett – Burman*, juntamente com seus códigos e as concentrações relativas a cada nível.

Variáveis independentes	Níveis		
	-1	0	1
	g.L <sup>-1</sup>	g.L <sup>-1</sup>	g.L <sup>-1</sup>
1 Sulfato de manganês	0,2	1,1	2
2 Acetato de sódio	0,3	1,65	3
3 Óleo de soja	0,2	1,1	2
4 Tween 80	0,1	0,3	0,5
5 Glicerol	1	5,5	10
6 Farelo de trigo	0	2,5	5
7 Glicose	1	5,5	10
8 Peptona	0,5	2,75	5
9 Nitrato de amônio	0,2	1,1	2
10 Ureia	1	11	10
11 Ácido acético	0,5	2,75	5

O cultivo utilizou 20 mL do meio de cultura, composto de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g.L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1 g.L<sup>-1</sup>, NaCl 0,05 g.L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 0,25 g.L<sup>-1</sup>, e 0,5 mL de solução de succinato de sódio 50

mmol.L<sup>-1</sup> (pH 4,5) e 3,15 mg de células e esporos. De acordo com o planejamento experimental, cada erlenmeyer foi acrescido de diferentes fontes de carbono, nitrogênio e indutores (Tabela 2). Os cultivos foram mantidos a 30°C, 100 rpm durante 20 dias. Amostras foram retiradas no dia 0, 5, 12 e 20, para análise da atividade enzimática da MnP.

Tabela 2 - Planejamento experimental *Plackett – Burman*, obtido com auxílio do software STATISTICA (StatSoft, v. 7.0), para produção de MnP a partir do cultivo do *C.subvermispora*.

Ensaio	Variáveis independentes										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	-1
2	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1
3	-1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1
4	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1
5	-1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1
6	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1
7	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1
8	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
10	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1
13	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1
15	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
PC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

### 2.4. Determinação da atividade da manganês peroxidase

Em tubos de ensaio, foram adicionados 100 µL de MnSO<sub>4</sub> 1 mmol.L<sup>-1</sup>, 100 µL succinato de sódio 20 mmol.L<sup>-1</sup>, 100 µL de Lactato de sódio 250 mmol.L<sup>-1</sup>, 100 µL de albumina 1% m.v<sup>-1</sup>, 500 µL do extrato enzimático sem células, 100 µL de vermelho fenol 0,1% m.v<sup>-1</sup>, 50 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 mmol.L<sup>-1</sup>. Após 10 minutos, foram adicionados 50 µL de NaOH 2,5 mmol.L<sup>-1</sup>. A absorbância foi obtida a 610 nm. A atividade

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

enzimática da MnP foi calculada utilizando equação 2 [11].

$$MnP (U.L^{-1}) = \frac{Abs_{610nm} \times 10^6}{\epsilon \times volume (mL) \times Tempo (min)} \quad (2)$$

$\epsilon$  = coeficiente de extinção do fenol oxidado a 610 nm = 4460 L.m<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

### 3. Resultados e discussões

A Figura 1 apresenta a atividade da MnP dos 16 ensaios e ponto central obtida nos 5º, 12º e 20º. No 5º dia, os ensaios 6 e 7 apresentam as maiores atividades enzimáticas 67 e 45 U.L<sup>-1</sup>, respectivamente. No 20º dia os ensaios 1, 3 e 7 apresentaram as maiores atividades enzimáticas 88,5, 88,2, 79,1 U.L<sup>-1</sup>, respectivamente. No entanto, a maior atividade enzimática foi observada no 12º dia para os ensaios 1 e 6, 93,6 e 92,3 U.L<sup>-1</sup>, respectivamente. A menor produção da MnP foi observada nos ensaios 2, 4, 12 e 14. Para todos estes ensaios, a produção da MnP foi inferior a 10 u.L<sup>-1</sup> em todos os dias.

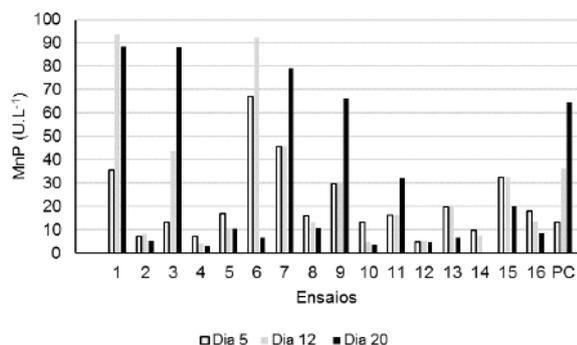


Figura 1 - Atividade enzimática da manganês peroxidase durante o cultivo do fungo *C. subvermispora* utilizando diferentes fontes de carbono, nitrogênio e indutores.

Os dados obtidos a partir dos 18 ensaios (figura 1) foram tratados utilizando o programa Statistica 7®. A partir das análises estatísticas, apenas o sulfato de manganês, na concentração utilizada no ensaio, influenciou negativamente a produção da MnP, Figura 2.

O MnSO<sub>4</sub>, na concentração de 1 mmol.L<sup>-1</sup>, induziu a produção de MnP 750 U.L<sup>-1</sup> no cultivo do *Fomes scheroedermeus* [13]. Analisando a Tabela 1, observamos que a menor concentração de sulfato de manganês

utilizada 0,2 g.L<sup>-1</sup> corresponde a 1,32 mmol.L<sup>-1</sup>. Isto pode explicar o comportamento repressor do sulfato de manganês na produção da MnP pelo *C. subvermispora*, neste trabalho.

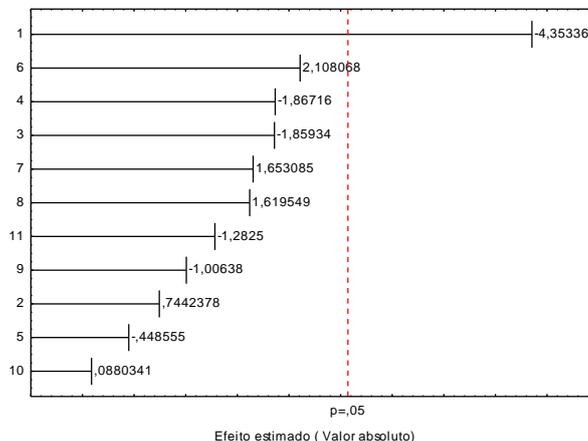


Figura 2 – Diagrama de Pareto para avaliação das variáveis na produção da manganês peroxidase pelo *C. subvermispora*.

De acordo com o planejamento experimental apenas o sulfato de manganês influencia a produção da MnP pelo *Ceriporiopsis subvermispora*. Entretanto outras variáveis, como pH, temperatura e velocidade de agitação do cultivo, concentração do inóculo são outras variáveis que podem interferir e que não foram exploradas neste trabalho.

### 4. Conclusão

O íon Mn<sup>2+</sup> apresentou efeito significativo na produção da manganês peroxidase pelo *Ceriporiopsis subvermispora* no 20º dia de cultivo.

### 5. Referências bibliográficas

- [1] DOMINGOS, M.; SOUZA-CRUZ, P. B.; FERRAZ, A.; PRATA, A. M. R. A new bioreactor design for culturing basidiomycetes: Mycelial biomass production in submerged cultures of *Ceriporiopsis subvermispora*. *Chemical Engineering Science*, v. 170, p.670-676, 2017.
- [2] CHEN, W.; ZHENG, L.; JIA R., WANG, N. Cloning and expression of a new manganese peroxidase from *Irpex lacteus* F17 and its application in decolorization of reactive black 5; *Process Biochemistry*, v.50, Issue 11, p. 1748-1759, 2015.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

- [3] BILAL, M.; ASGHER M.; PARRA-SALDIVAR R.; HU, H.; WANG, W.; ZHANG, X.; IQBAL, H. M. N. Immobilized ligninolytic enzymes: An innovative and environmental responsive technology to tackle dye-based industrial pollutants – A review.; *Science of The Total Environment*, v. 576, p.646-659, 2017.
- [4] JANUSZ, G.; KUCHARZYK, K. H.; PAWLIK, A.; STASZCZAK, M.; PASZCZYNSKI, A. J. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignina peroxidase: Gene expression and regulation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 52, p. 1-12, 2013.
- [5] KHATOON, N.; JAMAL, A.; ALI, M. I. Polymeric pollutant biodegradation through microbial oxidoreductase: A better strategy to safe environment. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 105, p. 9-16, 2017.
- [6] MARTÍNEZ, A. T. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme and Microbial Technology*, v.30, p. 425-444, 2002.
- [7] FARIA, R. A.; MILAGRES, A. M.; CARVALHO, W. Effects of manganese, 2, 5-xylydine, veratryl alcohol and tween 80 on the production of ligninolytic enzymes by *Ceriporiopsis subvermispora*. *African Journal of Biotechnology*. Issue 19, v.14, p.1675- 1685, 2015.
- [8] WONG, D. W.S. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 157, p. 174-209, 2009.
- [9] MACIEL, M. J.M.; SILVA, A.C.; RIBEIRO, H. C. T. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review. *Eletronical journal Biotechnology.*, v. 13, p. 14-15, 2010. Disponível em: <[https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-34582010000600014&lng=es&nrm=iso](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-34582010000600014&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 0717-3458>
- [10] MENDES, A. A. Importância dos mediadores de baixa massa molar na biodegradação de madeira por *Ceriporiopsis subvermispora*. 121f. Tese (Doutorado em) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, USP, Lorena, 2008.
- [11] SILVA, M. L. C.; BRITO DE SOUZA, V.; SANTOS, V.S.; KAMIDA, H. M.; VASCONCELLOS-NETO, J.R.T.; GÓES-NETO, A.; KOBLITZ, M.G.B. Production of manganese peroxidase by *Trametes villosa* on unexpensive substrate and its application in the removal of lignin from agricultural wastes. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, v.5, p. 1067-1077, 2014.
- [12] SHNEIDER, W.D.H.; FONTANA, R.C.; MENDONÇA. S.; GONÇALVES DE SIQUEIRA, F.; DILLON, A.J.P.; GAMOSSA, M. High level production of laccases and peroxidases from the newly isolated white-rot basidiomycete *Marasmiellus palmivorus* VE111 in a stirred-tank bioreactor in response to different carbon and nitrogen sources. *Process Biochemistry*, v. 69, p. 1-11, 2018.
- [13] PAPINUTTI, V. L.; FORCHIASSIN, F. Optimization of manganese peroxidase and laccase production in the Southe America fungus *Fomes scherodermeus* (Lév.) Cke. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.30, p. 536-541, 2003.

## HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CASCA DE CAFÉ VISANDO A OBTENÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS

Durso<sup>1</sup>, T. F. A.; Sarrouh<sup>1</sup>, B.

<sup>1</sup>Universidade Federal de São João Del-Rei/ Programa de Pós-Graduação em Tecnologias para o Desenvolvimento Sustentável

E-mail: [thamires.durso@gmail.com](mailto:thamires.durso@gmail.com)

### 1. Introdução

Nos últimos anos, a preocupação com os impactos ambientais causados pelos combustíveis fósseis impulsionou o desenvolvimento de pesquisas na busca por processos renováveis e sustentáveis como alternativa de fontes energéticas. Os estudos com biomassas lignocelulósicas tem sido promissores, principalmente os que visam à produção de bioetanol, devido à composição e abundância dessas matérias-primas no mundo.

No Brasil, a casca de café é um dos resíduos lignocelulósicos provenientes da agroindústria que tem se tornado atrativo para diversos estudos biotecnológicos. Dentre os principais motivos pelo estudo de tal resíduo destaca-se a abundância com que é produzido no país, pois o território brasileiro é considerado o maior produtor mundial de café (OIC, 2018); pelo fato desse resíduo ser uma fonte de contaminação ambiental, quando descartado de forma inadequada (Esquivel; Jiménez, 2012); e a variedade de bioprodutos que podem ser produzidos a partir dessa matéria-prima devido à sua composição lignocelulósica, como o bioetanol.

Mas para a produção de bioetanol, após a realização dos pré-tratamentos da biomassa, diferentes fatores podem alterar a eficiência da hidrólise enzimática para a obtenção de açúcares fermentescíveis como: concentração do substrato, a atividade da celulase, condições de

reação (pH e a temperatura) (Biswas *et al.*, 2014), dentre outros como a eficiência do pré-tratamento e a inibição pelo produto final.

Uma das alternativas é utilizar o planejamento de experimentos, como o DOE (*Design of Experiments*). Neste tipo de planejamento distintos fatores são variados e analisados de forma simultânea, sendo que os dados são ajustados a modelos lineares ou quadráticos contendo informações sobre o processo em estudo (Hibbert, 2012; Teófilo & Ferreira, 2006). Consequentemente, os pesquisadores são capazes de extrair do processo em estudo o máximo de informações úteis, realizando o mínimo de experimentos, reduzindo como consequência, o uso de reagentes, tempo, entre outras vantagens (Barros Neto; Scarmino; Bruns, 2010).

Sendo assim, este estudo teve o intuito de analisar a influência de diferentes parâmetros utilizados no planejamento experimental da hidrólise enzimática para a obtenção de açúcares fermentescíveis a partir da casca de café.

### 2. Material e Métodos

As cascas “*in natura*” passaram pela etapa de limpeza, trituração e secagem em uma estufa até atingirem o teor de umidade de 10%. Em seguida, foram submetidas ao pré-tratamento ácido com o intuito de remover a fração hemicelulósica utilizando as condições: concentração de casca de café (10% m/v),

concentração de ácido sulfúrico diluído (0,5 % v/v) por 10 minutos a 121 °C (Santos, 2015).

Posteriormente, realizou-se a hidrólise alcalina para a remoção da lignina nas seguintes condições: concentração de sólido 12% (m/v); concentração de hidróxido de sódio 3,5% (m/v) e 30 minutos. A última etapa compreendeu a realização da hidrólise enzimática por meio do planejamento fatorial 2<sup>3</sup> (Tabela 1) para a obtenção de açúcares fermentescíveis.

Tabela 1 - Especificação dos níveis das variáveis no planejamento experimental 2<sup>3</sup> para a hidrólise enzimática da casca de café.

Variáveis	Níveis		
	(-1)	0	(+1)
Teor de Endoglucanase (FPU/g)	10	50	90
Teor de Betaglicosidase (CBU/g)	2	6	10
Tempo (minutos)	30	45	60

A determinação das concentrações açúcares redutores foi realizada por meio da técnica do DNS (Miller, 1959).

Tabela 2 - Condições experimentais e resultados obtidos no primeiro planejamento fatorial 2<sup>3</sup> completo para quantificação de açúcares redutores na hidrólise enzimática.

Ensaio	Endoglucanase (FPU/g)	Betaglicosidase (CBU/g)	Tempo (Horas)	Concentração de açúcares (g/L)
1	10 (-1)	2 (-1)	24 (-1)	9,8
2	90 (+1)	2 (-1)	24 (-1)	13,95
3	90 (+1)	10 (+1)	24 (-1)	15,37
4	90 (+1)	10 (+1)	72 (+1)	11,71
5	10 (-1)	10 (+1)	72 (+1)	14,60
6	10 (-1)	2 (-1)	72 (+1)	10,78
7	10 (-1)	10 (+1)	24 (-1)	11,92
8	90 (+1)	2 (-1)	72 (+1)	15,13
9	50 (0)	6 (0)	48 (0)	14,97
10	50 (0)	6 (0)	48 (0)	14,64
11	50 (0)	6 (0)	48 (0)	14,72

Após a realização do delineamento experimental, os dados foram submetidos à análise de variância ao nível de 90% de confiança.

### 3. Resultados e Discussão

A Tabela 2 contém os valores das concentrações de açúcares obtidas na quantificação pela metodologia do DNS após a realização da hidrólise enzimática de acordo com o planejamento fatorial 2<sup>3</sup> completo.

Pode-se perceber nos 3 primeiros ensaios (1,2,3) juntamente com os pontos centrais (9, 10 e 11), que o aumento da concentração das celulases aumentou o rendimento da hidrólise, ou seja, essa relação foi linear. Porém, o aumento da concentração de açúcares entre o ensaio 8 (ponto central com maior concentração de açúcar) e o ensaio 3 (ensaio com maior concentração de açúcar no planejamento) foi de apenas 2,67%. Portanto, o rendimento de açúcares foi insignificante se comparado ao aumento realizado na concentração das enzimas do ponto central para o ensaio 3.

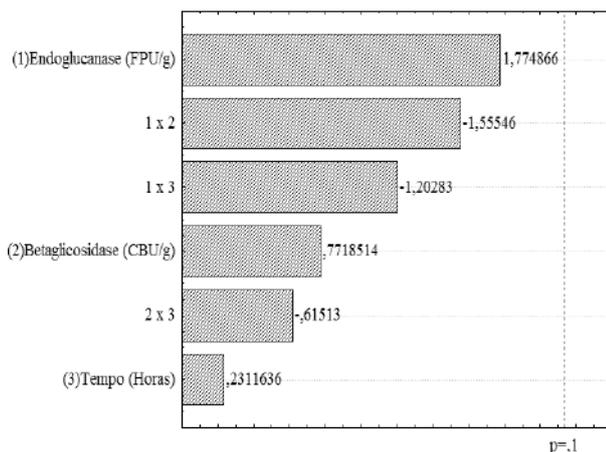
Através da análise desses resultados, percebe-se que o planejamento experimental é uma ferramenta extremamente importante na realização de experimentos, pois permite identificar até qual limite os parâmetros influenciam no processo para assim, evitar os gastos desnecessários. Outro parâmetro que interferiu minimamente nos resultados foi o tempo de hidrólise. Ao utilizar o nível superior

do tempo (72 horas), nota-se que não houve aumento do rendimento de açúcares como pode-se perceber ao comparar os ensaios 3 e 4, 5 e 7, 2 e 8 e 1 e 6. Provavelmente, ao estender o tempo de hidrólise ocorreu a inibição da ação das enzimas pelos produtos finais formados, ou seja, pela glicose e celobiose. Na Tabela 3 está descrita as análises dos efeitos e das interações das variáveis para concentração de açúcares redutores resultante do planejamento experimental.

Tabela 3 – Análise dos efeitos das variáveis para obtenção de açúcares redutores no planejamento fatorial  $2^3$ .

Fonte de variação	Efeitos	Erro Padrão	t (4)	p-valor
<b>Média</b>	13,41727	0,544153	24,65716	0,000016
<b>Endoglucanase (1)</b>	2,26500	1,276152	1,77487	0,150583
<b>Betaglicosidase (2)</b>	0,98500	1,276152	0,77185	0,483271
<b>Tempo (3)</b>	0,29500	1,276152	0,23116	0,828531
<b>1 x 2</b>	-1,98500	1,276152	-1,55546	0,194816
<b>1 x 3</b>	-1,53500	1,276152	-1,20283	0,295367
<b>2 x 3</b>	-0,78500	1,276152	-0,61513	0,571741

A influência dessas variáveis também pode



ser observada no Gráfico de Pareto (Figura 1).

Figura 1 - Gráfico de Pareto para concentração de açúcares redutores no planejamento fatorial completo  $2^3$ .

Por meio da análise dos efeitos, conclui-se que nenhuma variável interferiu de maneira

significativa para a obtenção de açúcares redutores no planejamento experimental realizado, pois ao nível de 90% de confiança nenhum p-valor foi menor que 0,1.

Pode-se perceber na Tabela 2, que por mais que nenhuma variável tenha sido significativa para a obtenção de açúcar, o efeito da endoglucanase para esse planejamento experimental foi positivo. Ou seja, em maiores concentrações dessa enzima, maiores concentrações de açúcares foram obtidas.

#### 4. Conclusão

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que o planejamento experimental é uma ferramenta essencial para a análise de vários parâmetros simultâneos em processos



## II SIMPÓSIO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS DE BIOTECNOLOGIA

11 a 13 de setembro de 2019

Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil



biotecnológicos. Por meio do planejamento experimental realizado, percebeu-se que o aumento da concentração de ambas as enzimas e o tempo não foram suficientes para aumentar o rendimento do processo, porém através da análise dos efeitos, percebeu-se que endoglucanase atuou positivamente na obtenção de açúcares redutores.

### 5. Referências bibliográficas

Barros Neto, B.; Scarmino, I. S.; Bruns, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na indústria, 4<sup>o</sup> ed, Porto Alegre: **Bookman**, 2010.

Biswas, Rajib, H. Uellendahl, and B.K. Ahring. "Wet Explosion Pretreatment of Sugarcane Bagasse for Enhanced Enzymatic Hydrolysis." **Biomass and Bioenergy**, 61 (February): 104–113. doi:10.1016/j.biombioe, 2014.

Esquivel, P.; Jiménez, V. M. Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International, Barking**, v. 46, n. 2, p. 488-495, 2012.

Hibbert, D. B. Experimental design in chromatography: A tutorial review. **Journal of Chromatography B**, 910, 2–13, 2012.

Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, US, v. 31, n. 3, p. 426- 428, Mar. 1959.

OIC. Organização Internacional do café. **Relatório sobre o mercado do café – julho/2018**. Disponível em <<http://www.ico.org/documents/cy2017-18/cmr-0718-p.pdf>>. Acesso: 12 agosto 2018.

Santos, A. F. C. Hidrólise ácido diluída da casca de café visando a obtenção de açúcares fermentescíveis. **In: Anais: XIII Congresso**

**de Produção Científica e Acadêmica da UFSJ e XII SIC (Seminário de Iniciação Científica)**. Universidade Federal de São João Del Rei – Campus Alto Paraopeba. Ouro Branco – MG, 2015.

Teófilo, R. F. & Ferreira, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculo de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, 29(2), 338– 350, 2006.

### 6. Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Federal de São João Del Rei pela oportunidade em realizar este trabalho e à CAPES pelo apoio financeiro.

## LÓGICA FUZZY COMO FERRAMENTA PARA CARACTERIZAÇÃO DO CICLO CELULAR EM EUCARIOTOS

Souza<sup>1</sup>, M. J. C.; Soares<sup>1</sup>, Y. F. B.; Nucci<sup>2</sup>, E. R.; Fabrino<sup>2</sup>, D. L.

<sup>1</sup> Universidade de São João del-Rei, Campus Alto Paraopeba, Graduando (a) do curso de Engenharia de Bioprocessos.

<sup>2</sup> Universidade de São João del-Rei, Campus Alto Paraopeba, Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos – DQBIO.

E-mail: [danifabrino@ufsj.edu.br](mailto:danifabrino@ufsj.edu.br)

### 1. Introdução

A divisão celular deve ser regulada e coordenada de maneira cuidadosa a fim de assegurar a formação de células filhas que possuam os genomas intactos. Logo, para que isso ocorra, ICARD et al. (2019) cita que é necessário um conjunto de eventos bioquímicos sequenciais o qual é chamado de ciclo celular.

Em uma célula de mamífero típica, toda a fase M é apenas uma pequena fração do tempo total do ciclo celular, já o período entre uma fase M e a próxima fase é chamado de interfase que se divide em subfases, mais precisamente, G1, S e G2.

De acordo com YANG et al. (2019), o ciclo celular é governado por complexos moleculares de quinases formados por subunidades catalíticas chamadas de quinases dependentes de ciclinas (CDKs) e por subunidades regulatórias chamadas ciclinas. As ciclinas possuem um comportamento específico tornando-as os marcadores bioquímicos mais eficientes na caracterização de cada fase do ciclo.

Durante a fase G1, nota-se que a taxa de expressão de ciclina D aumenta gradativamente, em seguida, ao decorrer do tempo da mesma fase a taxa da ciclina E também começa a aumentar, após o ponto de restrição, também se inicia o aumento de expressão da ciclina A. Já no início da fase S, a taxa de expressão da ciclina E começa decair rapidamente ao passo que se inicia a taxa de expressão da ciclina B, além disso, a expressão da ciclina A continua a aumentar cada vez mais.

A fase G2 se caracteriza com um aumento contínuo da taxa de expressão da ciclina B e o início do decaimento da ciclina A. Enfim, na fase

M, ocorre o término da degradação da ciclina A e uma degradação súbita de ciclinas do tipo B e D.

Segundo HUMERES e FRAGOIANNIS (2019), os fibroblastos são as células residentes mais comuns do tecido conjuntivo propriamente dito, elas são responsáveis pela síntese de moléculas da matriz extracelular. Este tipo celular pode escapar do ciclo celular e entrar em G0, ou seja, um estado quiescente e de menor atividade metabólica, sendo chamado então de fibrócito.

Deste modo, torna-se importante o desenvolvimento de uma ferramenta prática com intuito de não somente detectar em qual fase do ciclo a célula está, mas que também facilite a compreensão deste comportamento em particular. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um sistema inteligente utilizando-se da lógica fuzzy para caracterizar as fases do ciclo celular e possibilitar a modelagem de processos fisiológicos de uma célula eucariótica.

### 2. Materiais e Métodos

Foi realizado um estudo teórico do ciclo celular de modo a determinar os marcadores bioquímicos que melhor caracterizavam as fases do ciclo celular, em eucariotos. Deste modo, foram determinadas as variáveis de entrada e saída a serem inseridas no software Scilab, em seguida, foi avaliado o range destas variáveis com intuito de construir um sistema em que as respostas saíam de acordo com cada fase do ciclo celular.

#### 2.1. Seleção das Variáveis de Entrada

Os marcadores bioquímicos escolhidos foram as proteínas ciclinas devido ao seu comportamento

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

característico, porém não seria possível quantificá-las, logo, a proposta deste trabalho foi a de criar as funções de pertinência do sistema a partir das taxas de expressão dos quatro tipos de ciclinas conforme o ciclo avança com o tempo.

As variáveis de entrada determinadas foram a taxa de expressão dos quatro tipos de ciclina e o tempo. Além disso, os formatos de conjuntos fuzzy escolhidos na construção destas entradas foram trapezoidais e triangulares.

O range da taxa de variação das ciclinas foi escolhido para o intervalo  $[-1,1]$ , no qual zero seria o valor ideal caracterizado como o ponto em que a taxa de expressão das ciclinas seria constante. Este range foi selecionado de modo que se identifique uma taxa de variação teórica para o sistema. Já o range da variável tempo foi escolhido de acordo com a literatura ALVES e GUIMARÃES (2010), na qual o ciclo celular é dividido em um período de 16 horas, sendo 5 horas para fase G1, 7 horas para fase S, 3 horas para fase G2 e 1 hora para fase M. Isto é, para esta variável, foi determinado o intervalo  $[0,16]$ .

A partir do perfil de expressão da ciclina com tempo, e na relevância da variação de cada um dos tipos de ciclinas para a classificação final do ciclo, as funções de pertinência referente às variáveis de entrada foram montadas utilizando-se as variáveis linguísticas e os correspondentes valores linguísticos mostrados na tabela (1).

Tabela 1 - Modelo de variáveis linguísticas de entrada.

Variáveis linguísticas	Valores linguísticos
Ciclina A	"Zero negativa", "zero", "zero positiva".
Ciclina B	"Zero negativa", "zero", "zero positiva".
Ciclina D	"Zero negativa", "zero", "zero positiva".
Ciclina E	"Zero negativa", "zero", "zero positiva".
Tempo	"G1", "Fase S", "G2", "Fase M".

## 2.2. Seleção das Variáveis de Saída

Com o intuito de caracterizar as fases do ciclo celular, determinou-se uma função de pertinência de saída denominada como fases do ciclo, com o conjunto fuzzy no formato trapezoidal e um range referente ao intervalo  $[0,10]$ . Além disso,

adicionou-se a fase G0 referente ao período quiescente de uma célula.

Com o objetivo principal de propor um sistema inteligente de maneira a caracterizar as fases do ciclo celular conforme os momentos fisiológicos de um fibroblasto pertinentes à interfase, a quiescência, a mitose e a citocinese, adotou-se a variável linguística e seus correspondentes valores linguísticos apresentados na tabela (2).

Tabela 2 - Modelo de variáveis linguísticas de saída.

Variáveis linguísticas	Valores linguísticos
Fases do ciclo	"G1", "Fase S", "G2", "Fase M", "G0".

## 2.3. Construção das Regras

As regras foram modeladas de acordo com os conhecimentos do autor adquiridos a partir da literatura apresentada por NUCCI et al. (2005).

- IF {ciclina\_E IS ZERO\_negativa} AND {ciclina\_A IS ZERO\_positiva} AND {tempo IS Fase\_S} THEN {fases\_ciclo IS S};
- IF {ciclina\_A IS ZERO\_negativa} AND {ciclina\_B IS ZERO\_positiva} AND {tempo IS G2} THEN {fases\_ciclo IS G2};
- IF {ciclina\_D IS ZERO\_positiva} AND {ciclina\_E IS ZERO\_positiva} AND {tempo IS G1} THEN {fases\_ciclo IS G1};
- IF {ciclina\_D IS ZERO\_negativa} AND {ciclina\_B IS ZERO\_negativa} AND {tempo IS Fase\_M} THEN {fases\_ciclo IS M};
- Else {fases\_ciclo IS G0}.

É importante salientar que na fase G0 não há expressão de ciclinas, portanto, ela foi adicionada como uma negação das sentenças E-fuzzy originais (1 a 4) que caracterizam as outras fases do ciclo totalizando-se 8 regras.

## 3. Resultados e Discussões

O modelo de lógica fuzzy proposto foi executado e gerou 4 superfícies de resposta em função das variáveis de entrada: tempo e taxa de expressão das ciclinas.

Baseando-se no intervalo de tempo correspondente a cada fase do ciclo determinou-se quatro tempos específicos teóricos em que o fibroblasto estaria hipoteticamente em um dos processos fisiológicos correspondentes àquela fase

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

do ciclo. Assim, gerou-se superfícies de resposta com as interações entre duas variáveis de entrada nos eixos X e Y e suas respectivas respostas no eixo Z.

Com intuito de obter uma resposta em função da fase G1, foram avaliadas as interações referentes às Ciclinas D e E ao decorrer de 2 horas obtendo-se a resposta representada na figura (1).

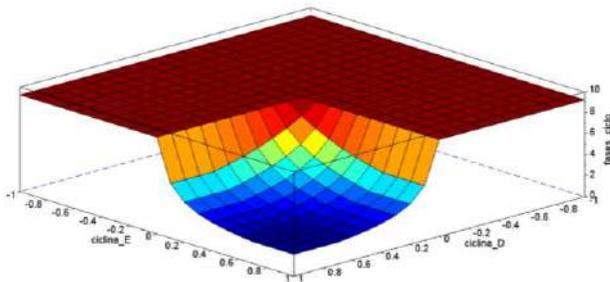


Figura 1 – Superfície de resposta das interações entre Ciclinas D e E. Tempo de 2 horas.

Observa-se que à proporção em que a taxa de expressão das Ciclinas D varia de zero para zero positivo, para uma resposta em função de G1, as Ciclinas E também irão apresentar o mesmo comportamento. Este fato poderia ser associado à principal função das Ciclinas D, destacada por BENDRIS et al. (2015), que dizem que ao se ligarem às CDK4 e CDK6, este tipo de ciclina atua no controle das Ciclinas E levando-as então através do ponto de restrição em G1 e conduzindo a célula à caminho da fase S.

Em segundo lugar, com intuito de obter uma resposta em função da fase S, foram avaliadas as interações referentes às Ciclinas A e E, ao decorrer de 8 horas.

Notou-se que à medida que a taxa de expressão das Ciclinas A varia de zero para zero positivo, as Ciclinas E irão apresentar uma expressão variando de zero para zero negativo (Figura 2).

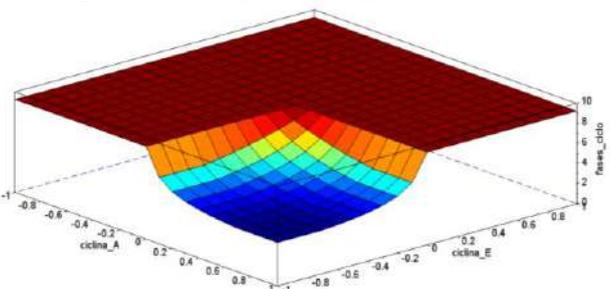


Figura 2 – Superfície de resposta das interações entre Ciclinas A e E. Tempo de 8 horas.

Isto poderia ser associado ao fato de após as Ciclinas E terem estimulado as proteínas responsáveis pela replicação do DNA, elas se degradam de forma rápida na fase S, ao passo que as Ciclinas A ao se ligarem com as CDK2 agem na duplicação do DNA por meio da ativação da DNA-polimerase. Neste contexto, SÁNCHEZ e DYNLACHT (2005) destacam a importância destes três tipos de genes para progressão do ciclo pela fase S.

Em seguida, a fim de obter uma resposta em função da fase G2, as interações referentes às Ciclinas A e B foram avaliadas ao decorrer de 13 horas.

Observou-se que à proporção em que a taxa de expressão das Ciclinas A começa a variar de zero para zero negativo, as Ciclinas B continuarão a apresentar uma expressão variando de zero para zero positivo (Figura 3).

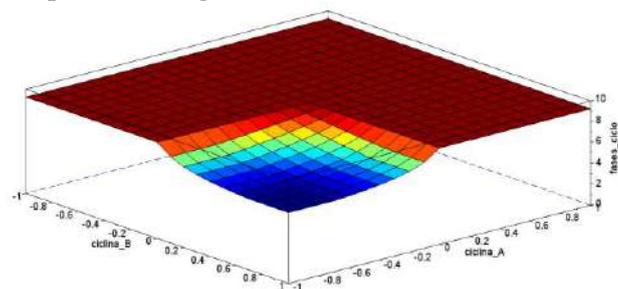


Figura 3 – Superfície de resposta das interações entre Ciclinas B e A. Tempo de 13 horas.

Este fato ocorre porque neste tempo em questão a duplicação do DNA estaria chegando ao final iniciando-se a degradação das Ciclinas A, já o aumento das Ciclinas B seria uma resposta em função da indução de entrada da célula em mitose, em acordo com o trabalho de HARASHIMA et al. (2013).

Já com a finalidade de se obter uma resposta em função da fase M, avaliou-se as interações referentes às Ciclinas D e B no decorrer de 15 horas e 30 minutos e a resposta obtida se encontra representada na figura (4).

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

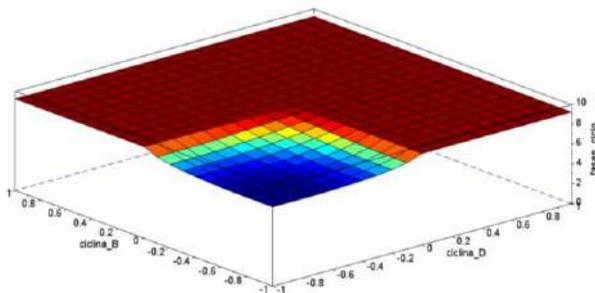


Figura 4 – Superfície de resposta das interações entre Ciclinas B e D. Tempo de 15 horas e 30 minutos.

Conforme pode ser observado, as taxas de expressão das Ciclinas D e B variam de zero para zero negativo e este comportamento poderia descrever a degradação destas proteínas que é inclusive associado ao “fim” do ciclo celular, no qual a célula irá realizar a mitose.

É importante frisar que nas quatro superfícies de resposta a região referente à fase G<sub>0</sub> apareceu como uma superfície plana, o que já era esperado visto que para este modelo o estado de um fibrócito foi descrito como uma negação das interações entre as ciclinas durante as fases do ciclo celular. Já para as demais fases, o modelo representou uma resposta aos estímulos de fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), mais precisamente, uma mensagem para divisão celular e síntese de moléculas da matriz extracelular durante um processo de cicatrização.

#### 4. Considerações Finais

A partir dos resultados obtidos, pode-se dizer que a utilização da lógica fuzzy para modelagem de processos fisiológicos de uma célula eucariota poderia se apresentar como um ótimo modelo de apoio à decisão para diversas áreas da biotecnologia aplicada à saúde. Isto é, tanto para problemas relacionados com a engenharia de tecidos quanto no monitoramento de culturas celulares para diferentes fins ou até mesmo para prognósticos referentes ao perfil comportamental de neoplasias entre outras doenças.

#### 5. Referências

ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R.; **CONCEITOS E MÉTODOS para formação de profissionais em laboratórios DE SAÚDE**. vol 2, 290p. Cap 5: Cultivo celular:

216–253p. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010.

BENDRIS, N.; LEMMERS, B.; BLANCHARD, J. M.; review(2015). Cell cycle, cytoskeleton dynamics and beyond: the many functions of cyclins and CDK inhibitors. **Cell Cycle** 14:12, June 2015: 1786–1798p.

HARASHIMA, H.; DISSMEYER, N.; SCHNITTGER, A.; review(2013). Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. **Trends in Cell Biology**, vol. 23, No 7, July 2013: 345–356p.

HUMERES, C.; FRAGOIANNIS, N. G.; review(2019). Fibroblasts in the infarcted, Remodeling, and Failing heart. **JACC: Basic To Translational Science**, vol.4, No. 3, June 2019: 449–467p.

ICARD, P.; FOURNEL, L.; Wu, Z.; ALIFANO, M.; LINCET, H.; review(2019). Interconnection between metabolism and cell cycle in cancer. **Trends in Biochemical Sciences**, Vol. 44, No. 6, June 2019: 490–501p.

NUCCI, E.; SILVA, R. G.; GOMES, T. C.; GIORDANO, R. C.; CRUZ, A. J. G. reserch(2005). A fuzzy logic algorithm for identification of the harvesting threshold during PGA production by *Bacillus megaterium*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, Vol. 22, No. 04, October - December 2005: 521–527p.

SÁNCHEZ, I.; DYNLACHT, B. D.; review(2005). New insight into cyclins, CDK, and cell cycle control. **Seminars in Cell & Developmental Biology** 16 (2005), 311–321p.

YANG, L.; CAI, K.; HUANG, H.; ZHANG, Y.; ZONG, Y.; WANG, S.; SHI, J.; LI, S.; LIAO, F.; LU, M.; GUO, W.; reserch(2019). Comparative analysis of anatomy, gene expression of *Vaccinium corymbosum* cyclins and cyclin dependent kinases during the flower bud and fruit ontogeny. **Scientia Horticulturae** 251 (2019), 252–259p.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

## DESENVOLVIMENTO BIOTECNOLÓGICO DE *SCAFFOLD* ASSOCIADO A ESFOLIADO DE TALCO DE PEDRA SABÃO PARA REPARO ÓSSEO

Costa<sup>1</sup>, P. H. M.; Medrado<sup>2</sup>, N. V.; Souza<sup>3</sup>, S. M.; Morais<sup>3</sup>, H. L. O.; Prado<sup>4</sup>, M. C.; Santos<sup>5</sup>, J. C. C.; Neves<sup>5</sup>, B. R. A.; Manhabosco<sup>4</sup>, T. M.; Barboza<sup>4</sup>, A. P. M.; Resende<sup>2</sup>, R. R.; Alvarenga<sup>1</sup>, E. L. F. C.

<sup>1</sup> Universidade Federal de São João del-Rei, Departamento de Ciências Naturais/Laboratório de Biologia do Reparo e Nanomateriais

<sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Bioquímica/Laboratório de Sinalização celular e Nanobiotecnologia

<sup>3</sup> Instituto Federal de Minas Gerais – Campus Santa Luzia, Laboratório de Física e Química

<sup>4</sup> Universidade Federal de Ouro Preto, Departamento de Física/Laboratório de Eletroquímica e Difusão

<sup>5</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Física/Laboratório de Nanoscopia

E-mail: pedrohmdc@hotmail.com

### 1. Introdução

Os *scaffolds* são matrizes celulares de diferentes formulações que estão sendo utilizadas pela engenharia de tecidos para o reparo de órgão e tecidos. O desenvolvimento de *scaffolds* utilizando colágeno tipo I para aplicações *in vivo* vem sendo amplamente associados a biomateriais por demonstrarem boa biocompatibilidade e reabsorção completa pelo organismo com substituição por tecido autólogo (Rahmanian-Schwarz *et al.*, 2013).

O talco de pedra sabão em monocamadas ou poucas camadas tem resistência mecânica similar à do grafeno. Ademais, assim como o grafeno, o talco é suficientemente flexível para formar dobras. Contudo, as monocamadas de talco possuem espessura maior que um átomo, apresentando seus valores de rigidez flexural trinta vezes maiores que a do grafeno.

Pesquisas recentes mostram que a adição de nanopartículas de talco em polímeros resulta em melhorias significativas na resistência do material (Balamurugan & Maiti, 2010). Dessa forma, tal como materiais a base de grafeno, o talco de pedra sabão em monocamadas ou poucas camadas são excelentes candidatos

para serem aplicados como material de reforço em *scaffolds* para aplicação biológica.

Portanto, objetivou-se avaliar a biocompatibilidade do esfoliado de talco associado à matriz de colágeno bovino tipo I em cultura primária de osteoblastos.

### 2. Materiais e métodos

Realizou-se a extração de osteoblastos da calvária de ratos Wistar neonatos de até cinco dias sob apreciação da CEUA-UFSJ sob protocolo 009/2018.

Em seguida, foram plaqueados  $1 \times 10^4$  osteoblastos por poço em uma placa de 96 poços submetidos as concentrações de 1%, 5%, 10% e 20% de esfoliado de talco de pedra sabão em colato de sódio para a realização de um ensaio de viabilidade utilizando MTT.

Após a análise do ensaio de viabilidade, foram selecionadas as concentrações para preparação de *scaffolds* de colágeno extraído de tendão bovino adicionando-se o esfoliado de talco de pedra sabão em colato de sódio.

Posteriormente, plaqueou-se  $1 \times 10^4$  osteoblastos por poço sobre os *scaffolds* preparados (colágeno bovino, colágeno com talco 5% e colágeno com talco 10%) e sobre

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

uma lamínula (grupo controle) para a realização de ensaios de viabilidade utilizando *Alamar blue* nos dias 3, 7 e 14. Ademais, foram recolhidos os meios de cultura nos dias 3, 7, 11 e 14 para uma análise da produção de fosfatase alcalina (ALP).

Seguidamente, para a determinação da mineralização dos *scaffolds* pelos osteoblastos após 14 dias de cultivo, foi utilizada coloração de *Alizarin red* que permite identificar depósitos de cálcio.

Para a análise estatística utilizou-se uma análise de variância (ANOVA), seguido por teste de Bonferroni, no qual o valor de  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

### 3. Resultados e discussão

Por meio do ensaio de viabilidade com diferentes concentrações de esfoliado de talco de pedra sabão em colato de sódio, observou-se que as concentrações de 5% e 10% apresentaram valores próximos ao do controle em 24 e 48 horas. Já em 72 horas apenas o grupo 5% continuou com valores próximos ao grupo controle, enquanto o grupo 10% apresentou um decréscimo estatisticamente significativo (Figura 1). Com isso, as concentrações de 5% e 10% foram selecionadas para a confecção dos *scaffolds*.

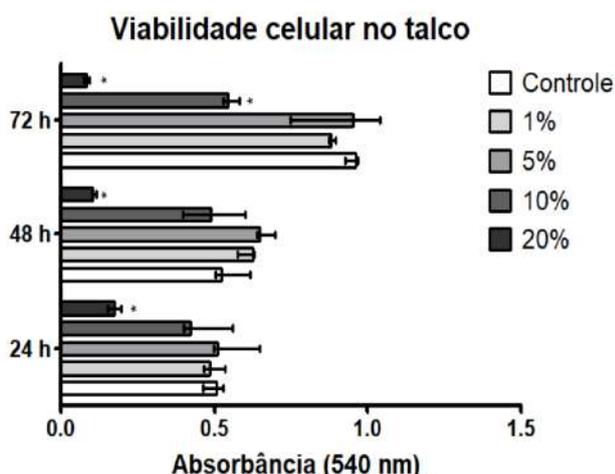


Figura 1 – Viabilidade frente a diferentes concentrações de talco.

Ao analisar o resultado da viabilidade dos osteoblastos plaqueados sobre os *scaffolds*, foi possível perceber uma diferença estatística entre viabilidade celular em *scaffolds* de colágeno com talco 5% quando comparado com os *scaffolds* de colágeno puro no dia 14. Não foram observadas diferenças estatísticas entre as viabilidades celulares envolvendo os *scaffolds* de colágeno com talco 5% e 10% e os *scaffolds* de colágeno puro nos dias 3 e 7 (Figura 2).

Assim como a viabilidade das células, a citotoxicidade é avaliada por meio do ensaio utilizando o *Alamar blue* que consiste em analisar a atividade metabólica das células (Bonnier *et al.*, 2015). Dessa forma, com o ensaio de viabilidade utilizando *Alamar blue*, foi possível inferir que o esfoliado de talco na concentração de 5% não é citotóxico.

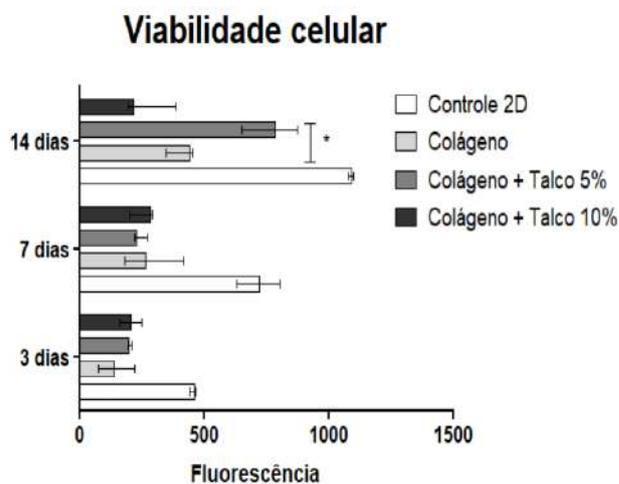


Figura 2 – Viabilidade celular nos *scaffolds*.

Verificou-se que a atividade de ALP foi semelhante entre os grupos de *scaffolds* embora inferiores e estatisticamente significativas em relação ao controle no dia 3 do experimento (Figura 3). Tal diferença não foi observada nos dias 7, 11 e 14 do experimento, exceto para o grupo de colágeno com talco 10% no 14º dia.

Utilizando o ensaio de ALP notou-se que o processo de mineralização está ocorrendo nos *scaffolds* e que os osteoblastos estão maduros,

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

uma vez que a enzima ALP está ligada ao processo de mineralização, além de ser produzida em alta quantidade nos osteoblastos maduros (Pei, X. *et al.*, 2014).

### Fosfatase alcalina

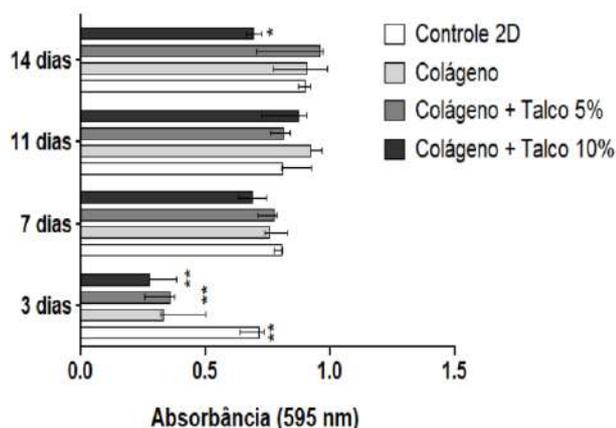


Figura 3 - Produção de fosfatase alcalina do sobrenadante.

Por meio da coloração com *Alizarin red* (Figura 4), observou-se maior deposição mineral nos *scaffolds* em relação ao grupo controle. Estes dados corroboram com estudos prévios que estudaram a maturação de osteoblastos em *scaffolds* à base de colágeno (Wang, *et al.*, 2016). Assim sendo, esta análise evidencia o potencial dos biomateriais testados para o processo de mineralização através da deposição de fosfato de cálcio (Castillo Diaz *et al.*, 2014).

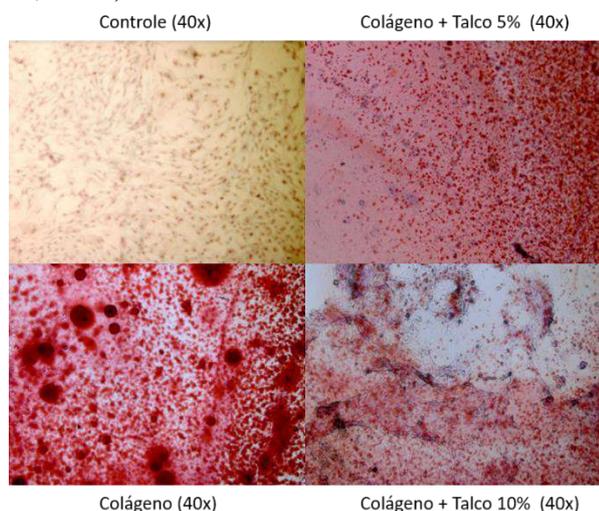


Figura 4 – Mineralização presente nos *scaffolds* (aumento 40x).

### 4. Conclusões

Os *scaffolds* de colágeno com 5% de talco se mostraram biocompatíveis e capazes de induzir o processo de mineralização.

### 5. Referências bibliográficas

RAHMANIAN-SCHWARZ, Afshin *et al.* *In vivo biocompatibility and biodegradation of a novel thin and mechanically stable collagen scaffold. Journal Of Biomedical Materials Research Part A*, [s.l.], v. 102, n. 4, p.1173-1179, 8 ago. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.34793>.

BALAMURUGAN, G. P.; MAITI S. N.; *Effects of nanotalc inclusion on mechanical, microstructural, melt shear rheological, and crystallization behavior of polyamide 6-based binary and ternary nanocomposites. Polymer Engineering & Science*, Wiley Online Library, v. 50, n10, p. 1978-1993, 2010.

BONNIER, F. *et al.* *Cell viability assessment using the Alamar blue assay: A comparison of 2D and 3D cell culture models. Toxicology In Vitro*, [s.l.], v. 29, n. 1, p.124-131, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2014.09.014>.

PEI, Xibo *et al.* *Single-walled carbon nanotubes/hydroxyapatite coatings on titanium obtained by electrochemical deposition. Applied Surface Science*, [s.l.], v. 295, p.71-80, mar. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.01.009>.

WANG, Xiaoyan *et al.* *The mechanism of a chitosan-collagen composite film used as biomaterial support for MC3T3-E1 cell differentiation. Scientific Reports*, [s.l.], v. 6, n. 1, dez. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep39322>.

DIAZ, Luis A Castillo *et al.* *Human osteoblasts within soft peptide hydrogels promote mineralisation in vitro. Journal Of Tissue Engineering*, [s.l.], v. 5, 21 fev. 2014.



## II SIMPÓSIO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA



Universidade Federal  
de São João del-Rei

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

---

SAGE Publications.  
<http://dx.doi.org/10.1177/2041731414539344>.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

## EFEITOS INDIRETOS DA TOLERÂNCIA ORAL ASSOCIADO À APLICAÇÃO TÓPICA DE NANOMATERIAIS NO REPARO DE FERIDAS

Costa<sup>1</sup>, R. A. C.; Oliveira<sup>1</sup>, R. M. S.; Barreto<sup>1</sup>, R. M.; Coelho<sup>1</sup>, M. M.; Monteiro<sup>1</sup>; J. F. S.; Ladeira<sup>2</sup>, L. O.; Carvalho<sup>3</sup>, C. R.; Alvarenga<sup>1</sup>, E. L. F. C.; Costa<sup>1</sup>, R. A.

<sup>1</sup> Universidade Federal de São João del Rei, São João del Rei, MG, Departamento Ciência Naturais-LABREN (Laboratório de Biologia da Regeneração e Nanomateriais).

<sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Física.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Morfologia- Laboratório do Sistema Linfóide e Regeneração.

E-mail: rosicastro\_a@hotmail.com

### 1. Introdução

Existem várias propostas de interferências no processo de reparo de feridas para induzir uma melhor cicatrização. O mecanismo de cicatrização de feridas tem como elemento principal o sistema imune atuando ativamente em todo processo para restabelecer a homeostase após a lesão por meio de diversos meios [1]. Carvalho e colaboradores demonstraram em seus trabalhos que a injeção parental de uma proteína tolerada (em adjuvante) em animais previamente tolerados por via oral acarreta uma diminuição da resposta imunológica para outras proteínas injetadas simultaneamente, ou pouco tempo depois [2]. A injeção parenteral de uma proteína (Ovalbumina) em um animal imunologicamente tolerante à mesma inibe processos inflamatórios reduzindo a cicatriz na pele do dorso de camundongos jovens, com deposição de matriz extracelular com padrões similares à pele intacta [3; 4]. A engenharia de tecidos tem pesquisado nos últimos anos substitutos como células, fatores de crescimento, matriz extracelular de diferentes formulações denominadas *Scaffolds*

associados a nanomateriais para substituir a pele [5]. Dentre eles diversos tipos de nanopartículas (NPs). As NPs de ouro têm demonstrado que seus efeitos antimicrobianos e antioxidantes melhoram a cicatrização de feridas e regeneração de tecidos [6], possuem também propriedades adjuvantes indicando que por si própria estimulam a imunidade entre outras. E quando conjugada com outras moléculas como peptídeos de Ovalbumina, melhoram especificidade nas células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas, exercendo um papel imprescindível para promover a imunidade ou tolerância, entre outros [7]. Assim, a hipótese desse projeto é verificar se a aplicação tópica de uma proteína associada à nanopartículas de ouro, para a qual o camundongo tenha sido previamente tolerizado por via oral, e a colocação de uma membrana de colágeno sobre a ferida altera a inflamação e a deposição de matriz extracelular durante o processo de fechamento de feridas na pele de camundongos.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

## 2. Material e Métodos

Foi utilizado camundongos Swiss (n=4-6) machos (8-10 semanas) divididos em quatro grupos experimentais, conforme tabela 1, para avaliar o processo de fechamento de lesões excisional de 6,5mm de diâmetro na pele do dorso. A indução de tolerância oral foi por ingestão voluntária da solução de 1:5 de clara de ovo, durante 5 dias (d) dos grupos: Tolerante e Tolerante+NP1+OVA+MC. O grupo NP1+MC e Salina receberam água *ad libitum*. Após 7d o grupo Tolerante foi imunizado *i.p.*, com 10µg OVA+1,6mg Al(OH)<sub>3</sub>, conforme tabela 1. A eutanásia foi realizada 7d e 60d, após a lesão e a pele foi fixada em formalina de Carlson por 24h, e corados com HE e Tricromático de Gomori. Projeto aprovado pelo CEUA-UFSJ-protocolo 049/2017.

Grupo	Tratamento Oral	<i>i.p.</i>	Tratamento Tópico
Salina	água <i>ad libitum</i>		Salina
Tolerante+ OVA <i>i.p.</i>	OVA	10µg OVA+ 1,6mg Al(OH) <sub>3</sub>	Salina
NP1+MC	água <i>ad libitum</i>		NP1+MC
Tolerante + NP1-OVA+MC	OVA		NP1-OVA+MC

Tabela I – Grupos experimentais.

As análises estatísticas foram adquiridas através do programa *GraphPad Prism 5.0*, por meio do *Test Newman-Keuls Multiple Comparison*.

## 3. Resultados e discussões

Com sete dias, observa-se qualitativamente que o grupo NP1+MC apresenta uma menor área de tecido de granulação em comparação com os demais grupos, completamente re-epitelizado, epitélio fino, pouco infiltrado inflamatório (figura 1) e presença de muitos fibroblastos conforme se observa na figura 2 e matriz extracelular densa e vascularizada. Já o grupo Tolerante+NP1+MC+OVA, também apresenta todas as características supracitadas, porém a área de tecido de granulação um

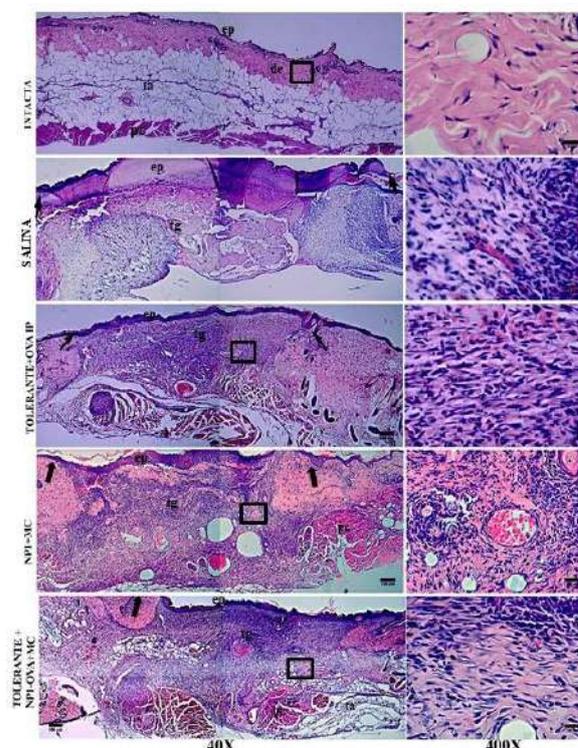


Figura 1 – Tratamento com nanopartículas de ouro e matriz de colágeno acelera o processo de cicatrização. Análise histológica do processo de reparo 7 dias após lesão excisional na pele do dorso de camundongos jovens. Coloração H&E. ep- epiderme, de-derme, tg- tecido de granulação, ta-tecido adiposo, pc-pâncreo carnoso.

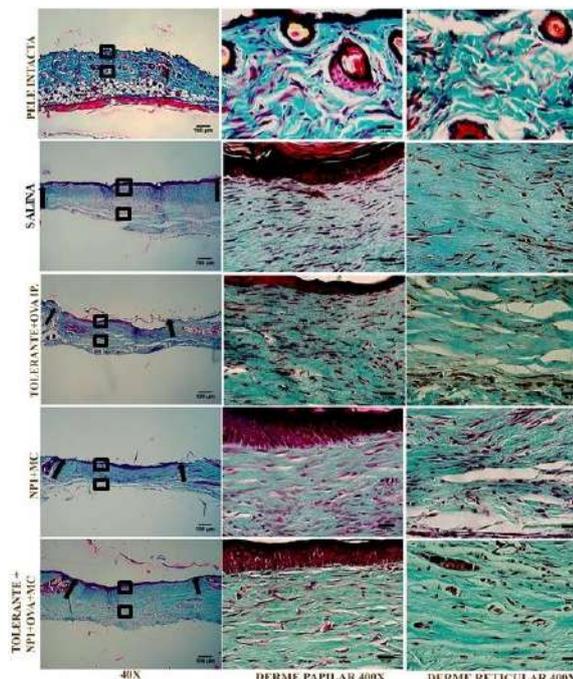
pouco maior (Figura 1). Com 60 dias após a lesão o grupo NP1+MC e Tolerante+NP1-OVA+MC apresentam uma área de cicatriz menor e melhor deposição de colágeno quando comparados ao grupo Salina e Tolerante. O grupo Tolerante+NP1-OVA+MC apresenta um remodelamento do colágeno com muitas fibras espessas e mais entrelaçadas quando se compara aos demais grupos, como uma tendência mais próxima da pele intacta, como mostra a Figura 3.

Reduzir a inflamação é uma estratégia para acelerar o fechamento de feridas crônicas e promover regeneração da pele e seus apêndices [1].

Costa e colaboradores demonstraram que o efeito indireto da tolerância oral interfere no processo de reparo de feridas de

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

pele de camundongos auxiliando em um melhor remodelamento da cicatriz [3; 4].



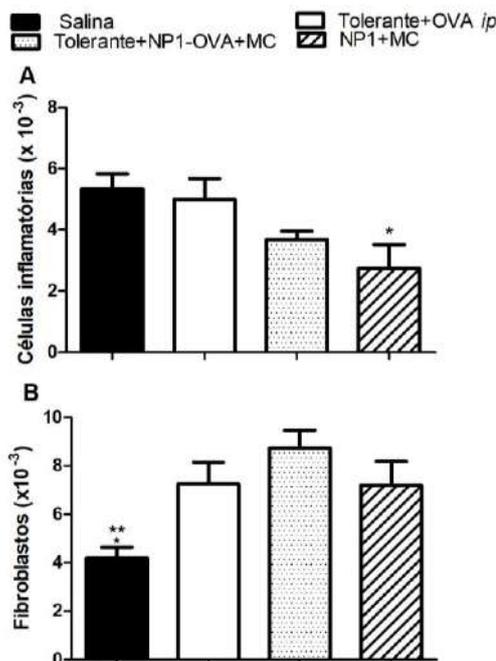
**Figura 3- Melhora no reparo de cicatriz do grupo tolerante NP1-OVA+MC.** Análise histológica do processo de reparo 60 dias após lesão excisional na pele do dorso de camundongos jovens. Coloração Tricromática de Gomori.

A figura 3 demonstra que é possível obter o efeito indireto da proteína tolerada com a aplicação tópica de um curativo, como já é demonstrado no grupo Tolerante- OVA *i.p.* Além disso, nesse trabalho utilizou-se a associação de nanopartículas de ouro que pode ter tido um efeito adjuvante quando aplicado em conjunto com a Ovalbumina.

O grupo contendo curativo com nanopartículas de ouro e matriz de colágeno demonstrou um bom resultado. Outros trabalhos evidenciam que nanopartículas de ouro tem efeito antimicrobiano no processo de cicatrização [6]. No entanto, como foi utilizado a matriz de colágeno não pode-se descartar o efeito do *Scaffold* da mesma.

Na associação dos efeitos indiretos da tolerância oral com matriz de colágeno e nanopartículas de ouro (grupo Tolerante-OVA+NP1+MC) verificou-se que a deposição de colágeno encontra-se espessa e entrelaçada, aproximando-se da pele intacta. Desta forma,

provavelmente está ocorrendo efeitos dos três eventos. Entretanto, outros estudos estão sendo feitos para certificarmos se há esse efeito adjuvante das nanopartículas de ouro.



**Figura 2: Aplicação tópica de nanopartículas de ouro associada a matriz de colágeno em animais previamente tolerizados diminui o infiltrado inflamatório e aumenta fibroblastos 7d após a lesão.** Em (A) células inflamatórias por  $\mu\text{m}^2 \times 10^{-3}$ . Em (B) Fibroblastos por  $\mu\text{m}^2 \times 10^{-3}$ . Foram adquiridos por meio de 10 áreas aleatórias da lesão, no aumento 400x. Dados representam média  $\pm$  erro padrão, \* $p \leq 0,05$  NP1+MC é significativamente menor que o grupo salina e Tolerante+OVA *ip*, \*\* $p \leq 0,01$  salina é significativamente menor que os demais grupos.

#### 4. Considerações finais

A tolerância sistêmica em conjunto com a aplicação tópica de NP1-OVA+matriz de colágeno melhora o reparo de ferida, porém não se observa regeneração de nenhum anexo da pele até 60d após a lesão. Esses dados demonstram que o tratamento é eficaz, sendo clinicamente favorável por ser uma via de aplicação rápida, menor tempo de tratamento e efeito adverso, o que o torna financeiramente viável. No entanto, outros estudos são necessários para entender melhor o mecanismo

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

de atuação das nanopartículas de ouro e sua citotoxicidade.

### 5. Referências Bibliográficas

1. LAROUCHE, J.; SHEORAN, S.; MARUYAMA, K.; MARTINO, M. M. (2018). *Immune Regulation of Skin Wound Healing: Mechanisms and Novel Therapeutic Targets*. Adv Wound Care (New Rochelle).
2. CARVALHO, C. R.; VERDOLIN, B. A.; and VAZ, N. M.; (1997). *Indirect effects of tolerance cannot be ascribed to bystander suppression*. *Scand J Immunol*, v.45, p. 276-81.
3. COSTA, R. A.; MATOS, L. B.; CANTARUTI, T. A.; DE SOUZA, K. S.; VAZ, N. M.; CARVALHO, C. R. (2016). *Systemic effects of oral tolerance reduce the cutaneous scarring*. *Immunobiology*. 221(3):475-85.
4. COSTA, R. A.; RUIZ-DE-SOUZA, R.; AZEVEDO Jr., G. M.; GAVA, E.; KITTEN, G. T.; VAZ, N. M.; CARVALHO, C. R. (2011). *Indirect effects of oral tolerance improve wound healing in skin*. *Wound Rep Reg* 19 487–497.
5. GANDHIMATHI, C.; VENUGOPAL, JR.; BHAARATHY, V.; RAMAKRISHNA, S.; KUMAR, S. D. (2014). *Biocomposite nanofibrous strategies for the controlled release of biomolecules for skin tissue regeneration*. *Int J Nanomedicine*. 9:4709-22.
6. VOLKOVA, N.; YUKHTA, M.; PAVLOVICH, O.; GOLTSEV, A. (2016) *Application of cryopreserved fibroblast culture with Au nanoparticles to treat burns*. *Nanoscale Res Lett* 11:22.
7. ZHOU, Q., ZHANG, Y., DU, J., LI, Y., ZHOU, Y., FU, Q., ZHANG, J., WANG, X., ZHAN, L., (2016). *Different-Sized gold nanoparticle Activator/Antigen increases dendritic cells accumulation in liver-Draining lymph nodes and CD8+ t cell responses*. *ACS Nano* 10, 2678–2692.

### 6. Apoio Financeiro

Apoio financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Rede de Mineira de Pesquisa e

Inovação para Bioengenharia de Nanossistemas (RM PI-BEN)- Financiado pela FAPEMIG - Processo No. TEC - RED-00282-16, PROPE-UFSJ.

11 a 13 de setembro de 2019

Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

## TOLERIZAÇÃO ORAL POR ZEÍNA SUGERE MELHORA NO REPARO ÓSSEO EM RATOS WISTAR

Peixoto<sup>1</sup>, I. O.; Silva<sup>1</sup>, R. S. R.; Costa<sup>1</sup>, B. H.; Costa<sup>1</sup>, P. H.M.; Almeida<sup>1</sup>, J. M.; Costa<sup>1</sup>, R. A.; Penoni<sup>1</sup>, A. C. O.; Silva<sup>1</sup>, M. A.; Carvalho<sup>2</sup>, C. R.; Alvarenga<sup>1</sup>, E. L. F. C.

<sup>1</sup> Laboratório de Biologia do Reparo e Nanomateriais - Universidade Federal de São João del-Rei, Departamento de Ciências Naturais

<sup>2</sup> Laboratório do Sistema Linfóide e Regeneração - Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Morfologia /Ciências Biológicas

E-mail: iagoolipei@yahoo.com.br

### 1. Introdução

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo metabolicamente ativo e tem a capacidade de mudar sua forma em resposta a mudanças em seu ambiente durante a vida adulta. Esse tecido possui funções como: sustentação, proteção de órgãos e estruturas vitais, armazenamento de substâncias, promover o suporte estrutural do corpo, proporcionar a hematopoese e auxiliar na regulação ácido-base do organismo, a fim de promover a homeostase. [7, 9]

Apesar de ser um tecido rígido, o osso está a todo tempo sofrendo um processo denominado “remodelamento”, envolvendo a ação de células multinucleadas originadas de monócitos circulantes, denominadas osteoclastos, que promovem o processo de reabsorção/degradação óssea, além da ação dos osteoblastos produzindo matriz nas Unidades de Reabsorção Óssea [2,11]. Os osteoclastos

clivam proteínas da matriz e degradam os cristais de hidroxiapatita, promovendo a liberação de íons cálcio e fosfato para o microambiente e também de forma sistêmica [1, 13]. Já os osteoblastos são formados a partir de células mesenquimais indiferenciadas após indução por proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) que ativam a transcrição de genes necessários para esse processo [6]. Em contrapartida, os osteoblastos produzem a matriz óssea orgânica não mineralizada (osteóide), sintetizando diversas proteínas como proteoglicanos, glicoproteínas, osteocalcina, osteopontina e a chamada “tropocolágeno”, sendo a última polimerizada em fibras de colágeno e a matriz colágena mineralizada pela incorporação de nanocristais de hidroxiapatita [4, 13].

O processo de cicatrização óssea após a ocorrência de fratura é formado principalmente

11 a 13 de setembro de 2019

Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

por três principais estágios: estágio de inflamação, reparo e remodelagem.

Após a lesão, inicia-se imediatamente a formação de um hematoma onde há a conversão de fibrinogênio em fibrina. Além de romper estruturas ósseas, o impacto também causa o rompimento de vasos sanguíneos, fazendo com que ocorra um influxo de células inflamatórias presentes na circulação periférica, dando início ao processo inflamatório [5].

A segunda fase é a reparativa que pode ser caracterizada pela presença do tecido fibrovascular que se infiltra na região do hematoma de forma a substituir o coágulo por fibras de colágeno disponibilizando uma região que será posteriormente mineralizada, representando dessa forma a formação do calo mole [5, 8, 10].

Por fim, temos a fase de remodelamento que ocorre também em um osso intacto pela atividade de osteoblastos e osteoclastos [5, 8].

A tolerância oral é conhecida há mais de 100 anos. Este processo fisiológico consiste em induzir uma baixa responsividade imunológica a um antígeno administrado por via oral e posteriormente inoculado por via parenteral [14, 15].

Estudos recentes têm demonstrado que a tolerância oral que é um fenômeno específico da resposta imune adaptativa, referindo-se à inibição específica da resposta imune a antígenos dependentes de células T contatados pela via oral antes da imunização parenteral. A ingestão de uma proteína não bloqueia a imunização para proteínas não relacionadas, mas uma reexposição à tolerados por via oral através da via parentérica inibe a imunização de

antígenos não relacionados, ou seja, proteínas injetadas em conjunto pela mesma via parentérica, ou logo em seguida, não são imunizadas, consequentemente bloqueando a inflamação específica. Esse fenômeno é chamado de efeito indireto da tolerância oral [3, 14, 15].

Até o momento não há trabalhos que correlacionem os efeitos da tolerância oral com o processo cicatricial do tecido ósseo. Sendo assim, a hipótese desse trabalho é que animais tolerizados à proteína zeína, quando reexpostos a essa proteína por via parenteral, antes da realização de um defeito ósseo, apresentam uma melhora no processo de cicatrização óssea.

Esse trabalho teve como objetivo investigar o efeito da tolerização por zeína no processo de recuperação de defeito ósseo em ratos Wistar.

## 2. Material e Métodos

Foram utilizados 18 ratos Wistar machos, sendo que todos os animais receberam ração e água *ad libitum*. A ração já continha a proteína zeína em sua composição. A proteína zeína purificada (Sigma, St Louis, MO) foi utilizada para imunização intraperitoneal. A imunização foi realizada com (Grupo Zeína) uma injeção intraperitoneal de 0,50 ml de 60 µg zeína acrescido de 9,6 mg de Al(OH)<sub>3</sub> imediatamente antes do processo cirúrgico. O grupo controle diluente recebeu 9,6 mg de Al(OH)<sub>3</sub> via injeção intraperitoneal imediatamente antes do processo cirúrgico, sendo injetado 0,5 ml da solução. Já o grupo controle salina recebeu 0,5 ml de solução salina via injeção intraperitoneal imediatamente antes do processo cirúrgico.

Realizou-se osteotomia no terço médio da região medial da tíbia direita com utilização de

11 a 13 de setembro de 2019

Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

uma broca trefina de 2 mm de diâmetro com os animais devidamente anestesiados. Músculo e pele foram suturados posteriormente. Analgésico e antibiótico foram oferecidos aos animais durante três dias após o processo de osteotomia. Todos os animais foram eutanasiados com dose letal de Quetamina e Xilasina após 14 dias.

Para que o processamento histológico pudesse ser realizado foi necessário descalcificar as tíbias com a utilização de uma solução de 10% de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA 10%), pH 7.2, por um período de 45 dias, realizando as trocas da solução a cada três dias.

O processamento histológico da região do defeito ósseo da tibia direita dos animais foi realizado de acordo com o procedimento padrão e, posteriormente, as secções foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E).

A significância estatística da diferença entre os grupos foi determinada usando One-Way ANOVA com Newman-Keuls Multiple Comparison Test. Em todos os testes fixou-se em 0,05 ou 5% ( $p < 0,05$ ) o nível de rejeição de nulidade.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ) pelo protocolo nº 054/2017.

### 3. Resultados

De acordo com análise qualitativa macroscópica da pele que recobria o local do defeito ósseo realizada 14 dias após o procedimento de osteotomia, foi possível

observar diminuição de edema, vermelhidão e crosta no grupo zeína em relação ao grupo salina e grupo  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , notando-se evidente melhora na cicatrização.

Realizou-se análise macroscópica morfométrica quantitativa dos defeitos ósseos onde foi possível observar fechamento acelerado da área do defeito ósseo no grupo zeína em relação aos grupos salina e  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , de acordo com medições da área não cicatrizada realizada com auxílio do software ImageJ. Grupo zeína, grupo salina e grupo  $\text{Al}(\text{OH})_3$  apresentaram área óssea não cicatrizada de 1,9  $\text{mm}^2$ , 2,5  $\text{mm}^2$  e 3,8  $\text{mm}^2$ , respectivamente.

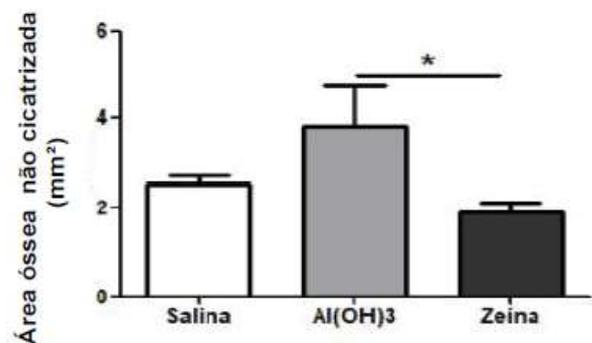


Figura 1. Gráfico representando área óssea não cicatrizada.

Segundo análise do material, realizou-se processamento histológico da área do defeito ósseo presente nas tíbias direita. O efeito da tolerização por zeína também foi possível de ser observado nas secções coradas com hematoxilina e eosina (H&E) onde os resultados sugerem que a inflamação no grupo zeína se manteve em pontos mais específicos em relação aos outros grupos, de forma que a

11 a 13 de setembro de 2019

Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

ossificação intramembranosa está reduzida e concentrada em uma menor área.

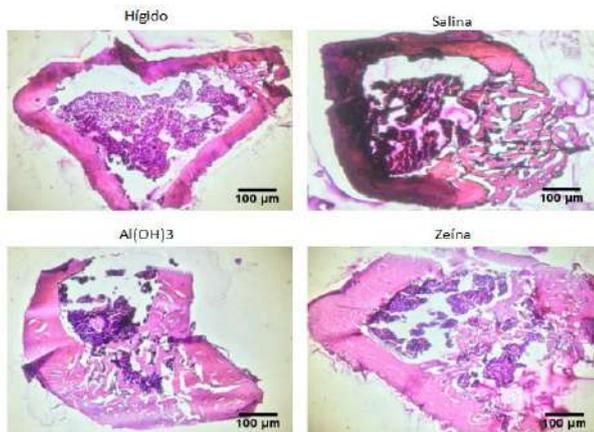


Figura 2. Fotomicrografia da formação do calo ósseo.

#### 4. Discussão

Em trabalho anterior desenvolvido pelo grupo de pesquisa, onde foi administrado em camundongos dose intraperitoneal de zeína +  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , ficou evidente diminuição macroscópica das cicatrizes de pele no grupo zeína em comparação com os mesmos grupos propostos pelo presente projeto [3]. CANTARUTI *et al.* (2017) verificaram que após 40 dias da realização da ferida o grupo zeína apresentou melhora no processo de cura da ferida com ausência de cicatriz em relação aos demais grupos. Nossos resultados corroboram com os achados evidenciados na literatura e pelo grupo. A observação de diferenças macroscópicas visíveis nas feridas em nosso trabalho em relação aos trabalhos já descritos na literatura em ferida de pele é um indicativo de que a tolerância oral por Zeína produz efeitos na cicatrização em ratos Wistar. Este projeto é pioneiro na realização de

tolerância oral em cicatrização tecidual em ratos Wistar.

Ao contrário do que se sabe sobre melhora na cicatrização de feridas de pele após tolerização por zeína ou OVA, melhora na cicatrização óssea devido a tolerização oral é desconhecida na literatura. O processo de cicatrização de defeitos ósseos é demorado pelo fato de uma interrupção do suprimento sanguíneo no local e pela falta de disponibilidade de cálcio e fósforo para o fortalecimento e endurecimento dos ossos [12].

#### 5. Considerações Finais

Pelas observações, faz-se necessário investigar quantitativamente o infiltrado inflamatório, células ósseas, vascularização e/ou angiogênese das lesões, visto que, a observação macroscópica demonstra contenção da ossificação do grupo zeína comparada aos outros grupos analisados, onde os calos ósseos se mostraram menos contidos. Em estudos futuros, onde possa ser analisada a presença e expressão de fatores de crescimento no local da ferida e correlaciona-los ao melhoramento do fluxo sanguíneo, diferenciação e recrutamento celular nesse local, teremos maior confiabilidade em afirmar os resultados encontrados neste trabalho.

#### 6. Referências Bibliográficas

- [1] BANKS, W. J. Tecidos de sustentação-osso. In: Histologia veterinária aplicada. 2.ed. São Paulo: Ed. Manole, 1992. p.137-166.
- [2] BASTIAN, O.; PILLAY, J.; ALBLAS, J.; LEENEN, L.; KOENDERMAN, L.; BLOKHUIS, T. Systemic inflammation and

11 a 13 de setembro de 2019

Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

fracture healing. *J. Leukoc. Biol.*, vol. 89 (8), p. 669–673, Maio, 2011.

[3] CANTARUTI, T.A.; COSTA, R.A.; SOUZA, K.S.; VAZ, N.M.; CARVALHO, C.R. Indirect effects of immunological tolerance to a regular dietary protein reduce cutaneous scar formation. *Rev. Immunology*, vol. 151(3), p. 314-323, julho, 2017.

[4] CAPULLI, M.; PAONE, R.; RUCCI, N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Rev. Arch. Biochem. Biophys*, vol. 561, p. 3-12, março, Novembro, 2014;

[5] CLAES L.; RECKNAGEL S.; IGNATIUS, A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat. Rev. Rheumatol.*; vol. 8(3), p.133–143, Janeiro, 2012.

[6] COWIN, S. C.; HEGEDUS, D. H.; Bone remodeling I: A theory of adaptive elasticity. *Journal of Elasticity*, vol. 6(3), p. 313–326, Julho, 1976.

[7] DANGELO, J. G.; FATTINI, C. C. Anatomia sistêmica e segmentar. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2007.

[8] EINHORN T. A., GERSTENFELD LC. Fracture healing: mechanisms and interventions *Nat Rev Rheumatol.* 2015 January; 11(1): 45–54.

[9] FREEMONT, A. J. Basic bone cell biology. *International journal of experimental pathology*, vol. 74,4, p. 411-416, Agosto, 1993.

[10] GHIASI, M. S.; CHEN, J.; VAZIRI, A.; RODRIGUEZ, E. K.; NAZARIAN, A. Bone

fracture healing in mechanobiological modeling: A review of principles and methods. *Rev. Bone Rep.*, vol. 6, p. 87-100, Junho, 2017.

[11] HADJIDAKIS, D.J.; ANDROULAKIS, I.I. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci*, Nova York, vol.1092, p. 385-396, Dezembro, 2006.]

[12] LIU, J., LI, X., ZHANG, D., JIAO, J., WU, L., HAO, F., & QIN, Y.-X. (2018). *Acceleration of Bone Defect Healing and Regeneration by Low-Intensity Ultrasound Radiation Force in a Rat Tibial Model. Ultrasound in Medicine & Biology.*

[13] MINISTÉRIO DA SAÚDE. Glossário Temático: Traumatologia e ortopedia - Projeto de Terminologia da Saúde. 2ª edição. Brasília – DF, 2012.

[14] PABST, O.; MOWAT, A.M.; Oral tolerance to food protein. *Rev. Mucosal Immunol*, vol. 5, p. 232-239. Fevereiro, 2012.

[15] WANG, X.; SHERMAN, A.; LIAO, G.; LEONG, K. W.; DANIELL, H.; TERHORST, C. HERZOG, R.W.; Mechanism of Oral Tolerance Induction to Therapeutic Proteins. *Rev. Adv. Drug Deliv.*, vol. 65(6), p. 759–773 junho, 2013.

## PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE XILANASE DO FUNGO *Kretzschmaria* sp. CRESCIDO EM SABUGO DE MILHO

Morales<sup>1</sup>, M. L.; Alfenas<sup>2</sup>, R. F.; Guimarães<sup>3</sup>, V. M. e Maitan-Alfenas<sup>3</sup>, G. P.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Mato Grosso, Departamento de Alimentos e Nutrição (DAN)/Pós-Gradando em Nutrição, Alimentos e Metabolismo.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Mato Grosso, Departamento de Engenharia Florestal

<sup>3</sup> Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM)

E-mail: marci\_10luz@hotmail.com

### 1. Introdução

A biomassa lignocelulósica é a fonte de carbono mais abundante e renovável do mundo, com potencial para conversão em combustíveis e diversos produtos químicos de interesse industrial (VISSER et al, 2013). A celulose e a hemicelulose são os principais polissacarídeos que compõem a parede celular vegetal, representando 40-50 e 20-30 %, respectivamente (GOMES et al, 2016).

A hidrólise enzimática da biomassa pode ser realizada por um conjunto de enzimas, incluindo celulasas, xilanases, ligninases e pectinases (VISSER et al, 2013). A xilanase ou endo  $\beta$ -1,4 xilanase (EC 3.2.1.8) catalisa a hidrólise de ligações xilosídicas na cadeia da xilana para produzir xilooligossacarídeos menores, que serão convertidos em xilose pelas  $\beta$ -xilosidases (EC3.2.1.37) (de QUEIROZ BRITO CUNHA et al, 2018).

As xilanases são amplamente utilizadas em diversas áreas da indústria, principalmente na panificação, clarificação de sucos, produção de xilooligossacarídeos, que possuem ação prebiótica, na indústria de ração animal, na indústria têxtil e de papel (POLIZELI et al, 2005). Alguns fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus* são amplamente descritos e utilizados para a produção de xilanases e outras enzimas comerciais (MAITAN-ALFENAS et al 2015).

Os fungos filamentosos são importantes degradadores da parede celular vegetal, sendo

responsáveis pela produção de uma grande quantidade e variedade de enzimas (MENEZES, 2018). *Kretzschmaria* sp., é um fungo fitopatogênico que pertence ao grupo dos fungos degradadores de madeira e está associado à podridão radicular de espécies florestais (ALFENAS, 2017), é um fungo com potencial enzimático e pouco descrito na literatura.

A fermentação semi-sólida (FSS) é uma das principais formas de produção de coquetéis enzimáticos fúngicos. Na FSS, resíduos agroindustriais são utilizados como fonte de carbono e matriz de crescimento para fungos, diminuindo os custos do processo e promovendo um destino adequado para esses resíduos (GUPTA et al, 2016).

A busca por novos microrganismos com potencial para produção enzimática e técnicas com apelo sustentável favorecem o aumento da produção de enzimas e a competitividade de mercado (MAITAN-ALFENAS et al 2015). O objetivo deste trabalho foi realizar a prospecção enzimática do fungo *Kretzschmaria* sp., utilizando diferentes fontes de carbono em sistema FSS, e purificar parcialmente a enzima xilanase, a partir do extrato obtido para a fonte de carbono indutora da melhor atividade enzimática.

### 2. Materiais e Métodos

#### 2.1 Crescimento do microrganismo e produção do extrato enzimático

O fungo *Kretzschmaria* sp. foi obtido da coleção micológica do Laboratório de

Patologia Florestal, da Universidade Federal de Mato Grosso, campus Sinop, sendo mantido em placas de batata-dextrose-ágar (BDA), a 28 °C, com repicagens periódicas.

O fungo foi cultivado em fermentação semi-sólida (FSS) usando diferentes resíduos agroindustriais como fontes de carbono: casca de soja, farelo de trigo, subugo de milho e cerne de teca. As enzimas secretadas foram extraídas de acordo com a metodologia de Gomes et al. (2016), utilizando tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, na proporção de 1:10 (g de matéria seca/ml de tampão). Os extratos foram homogeneizados, filtrados e centrifugados a 14000 rpm por 10 minutos, para obtenção do extrato enzimático bruto.

### 2.2 Atividades enzimáticas

As atividades enzimáticas foram determinadas para os diferentes extratos brutos. Os ensaios foram realizados em triplicata, em tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 5,0, a 50 °C. As atividades de FPase e endoglucanase foram determinadas utilizando como substratos papel de filtro Watman nº 1 e carboximetilcelulose (CMC) 1,25%, respectivamente. Para os ensaios de xilanase, mananase e pectinase, utilizou-se como substrato xilana *beechwood* (1,0 % p/v), locust bean gum (0,4% p/v) e ácido poligalacturônico (0,25 % p/v), respectivamente. A quantificação de açúcares redutores foi realizada pelo método de Miller (1959), efetuando-se a leitura de absorbância a 540 nm, estimada utilizando-se uma curva padrão construída com solução de glicose. As atividades de  $\beta$ -Glicosidase,  $\beta$ -xilosidase,  $\beta$ -manosidase,  $\alpha$ -galactosidase,  $\alpha$ -arabinofuranosidase, celobiohidrolase foram medidas usando os substratos sintéticos pNP $\beta$ Glc, pNP $\beta$ Xyl, pNP $\beta$ Man, pNP $\alpha$ Gal, pNP $\alpha$ Ara e pNP $\beta$ Cel, respectivamente, e lacase por ABTS, de acordo com a metodologia proposta por Visser et al. (2013).

O teor de proteínas foi determinado pelo método de Bradford (1976).

### 2.3 Purificação parcial da xilanase do fungo *Kretzschmaria* sp.

A purificação parcial da xilanase secretada pelo fungo *Kretzschmaria* sp. foi realizada em

*Fast Protein Liquid Chromatography - FPLC, ÄKTA system*. O processo de purificação foi realizado conforme Gomes et al. (2016), pela utilização de uma coluna trocadora de ânions Q-Sepharose (5x5 mL) previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. Foram aplicados 5 mL do extrato enzimático bruto de maior atividade de xilanase e tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. Para eluir as proteínas aderidas à coluna, foi utilizado gradiente salino linear (0 a 1M) de NaCl. A cromatografia foi conduzida a um fluxo de 4 mL/min, pressão de 0,3 MPa e frações de 2,5 mL foram coletadas em cada tubo. A determinação da atividade de xilanase e de proteínas foi realizada para cada fração, conforme descrito anteriormente.

### 2.4 Zimograma e eletroforese em gel de poliácridamida

O zimograma foi realizado de acordo com o método descrito por Laemmli (1970), com algumas modificações. Foram aplicados 15  $\mu$ L de amostra em gel de poliácridamida a 10 % (p/v), sendo adicionada ao gel de separação solução de xilana *beechwood* (1,0 % p/v) como substrato. A visualização das enzimas foi realizada de acordo com o método descrito por Falkoski et al. (2013).

A eletroforese em gel de poliácridamida SDS-PAGE foi realizada utilizando um gel de poliácridamida a 12 % (p/v) de acordo com Laemmli (1970), e o gel foi corado com nitrato de prata (Blum et al., 1987).

## 3. Resultados e Discussão

Os fungos são importantes degradadores da biomassa lignocelulósica e para isso produzem uma grande quantidade de enzimas, com ampla variedade e atividades complementares (GUPTA et al, 2016). *Kretzschmaria* sp. produziu diferentes enzimas quando cultivado nas fontes de carbono testadas e o sabugo de milho foi o que melhor induziu as atividades específicas para as enzimas endoglucanase, FPase, e xilanase (Tabela 1). De acordo com Wu et al (2019), o sabugo de milho possui uma grande quantidade de xilana e a presença deste polissacarídeo pode agir como indutor da enzima xilanase.

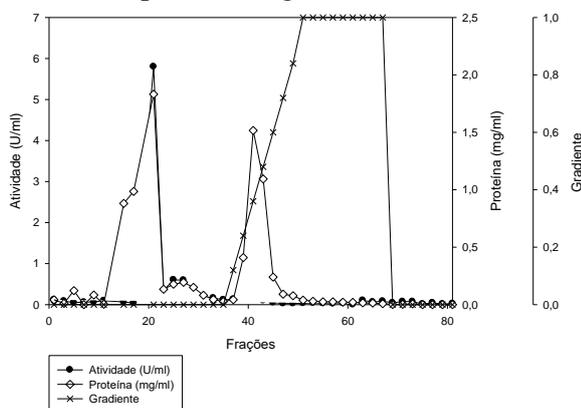
11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

**Tabela 1.** Atividades específicas (U/mg de proteína) dos extratos brutos produzidos pelo fungo *Kretzschmaria* sp. crescido diferentes fontes de carbono.

Atividade Específica (U/mg ptn)	Farelo de trigo	Sabugo de milho	Casca de soja	Cerne de teca
CMCase	2,223±0,57	11,523±1,55	0,902±0,11	1,333±0,16
FPase	0,522±0,16	1,216±0,08	0,554±0,02	1,421±0,03
Xilanase	8,997±0,25	59,534±0,50	5,686±0,66	0,895±0,30
Mananase	0,499±0,09	1,154±0,06	0,383±0,02	1,385±0,73
Pectinase	0,752±0,06	4,539±0,12	1,874±0,02	1,245±0,18
$\alpha$ -Galactosidase	1,941±0,26	1,001±0,00	2,814±0,46	0,162±0,02
$\alpha$ -Arabinofuranosidase	0,915±0,08	0,684±0,01	1,722±0,20	Nd
$\beta$ -Glucosidase	1,708±0,04	2,937±0,26	2,069±0,19	0,604±0,03
$\beta$ -Manosidase	0,118±0,01	Nd	0,201±0,03	Nd
$\beta$ -Celobiohidrolase	0,543±0,07	0,702±0,02	0,458±0,04	Nd
$\beta$ -Xilosidase	0,181±0,02	0,211±0,00	0,146±0,01	Nd
Lacase	0,003±0,00	0,001±0,00	0,005±0,00	0,003±0,00

Média  $\pm$  Desvio Padrão; Nd: Não detectado

O extrato bruto do fungo crescido em sabugo de milho foi submetido à etapa de purificação em cromatografia líquida de troca aniônica. Nesta etapa foi possível detectar três picos com atividade de xilanase. O primeiro e maior pico foi eluído antes do gradiente salino, o que caracteriza xilanase (s) de carga positiva no valor de pH 5,0. (Figura 1).



**Figura 1.** Perfil cromatográfico obtido após a aplicação do extrato enzimático bruto do fungo *Kretzschmaria* sp. em coluna de troca iônica Q-Sepharose.

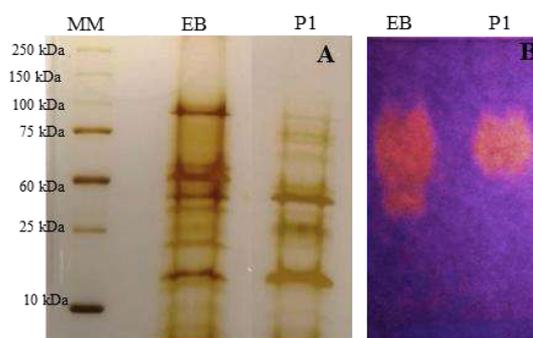
Gomes et al (2016) demonstraram que a purificação de xilanases do fungo *Chrysosporthe cubensis* em coluna de troca iônica também resultou em três picos de atividade de xilanase, o que pode ser explicado pela presença de diferentes isoformas.

Com apenas uma única etapa de purificação, foi possível obter um fator de purificação de 2,4 e um rendimento de 65 % (Tabela 2).

**Tabela 2.** Tabela de purificação da xilanase do fungo *Kretzschmaria* sp. crescido em sabugo de milho.

	Extrato Bruto	Troca Iônica
Proteína (mg)	0,475	0,130
Atividade (U)	30,398	19,780
Atividade Específica (U/mg)	63,995	152,154
Fator de Purificação	1	2,378
Rendimento (%)	100	65,071

Com a análise do gel SDS-PAGE, observa-se que uma única etapa não foi suficiente para total purificação do extrato, pois é possível visualizar mais de uma banda proteica (Figura 2A). Entretanto, pode-se observar no zimograma (Figura 2B) que a fração contendo o primeiro pico da purificação apresentou atividade de xilanase, e quando comparada com o extrato bruto, percebe-se que existem outras xilanases que foram secretadas pelo fungo *Kretzschmaria* sp. e que foram eliminadas na etapa de purificação, estando de acordo com o gráfico do perfil de purificação (Figura 1), que apresentou três picos.



**Figura 2.** A) Eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE 12%). MM: marcador molecular; EB: extrato bruto; P1: primeiro pico com atividade de xilanase obtido pela cromatografia de troca iônica. B) Zimograma comparando o extrato bruto e o primeiro pico da purificação em coluna Q-Sepharose com atividade de xilanase.

#### 4. Considerações Finais

O fungo *Kretzschmaria* sp. crescido em sabugo de milho como fonte de carbono apresentou as melhores atividades enzimáticas, principalmente para enzima xilanase.

A técnica de cromatografia de troca iônica utilizada permitiu a purificação parcial da xilanase, sendo necessário outras etapas para purificação total da enzima. Como perspectivas, a enzima deve ser caracterizada bioquimicamente para verificação de suas possíveis aplicações biotecnológicas.

#### 5. Referências Bibliográficas

ALFENAS, R.F. Principais doenças da Teca no Brasil. **Revista Opiniões**, 2017.

BLUM, H., BEIER, H., GROSS, H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, v.8, p. 93-99. 1987.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72, 248–254, 1976.

de QUEIROZ BRITO CUNHA, C.C.; GAMA, A.R.; CINTRA, L.C.; BATAUS, L.A.M.; ULHOA, C.J. Improvement of bread making quality by supplementation with a recombinant xylanase produced by *Pichia pastoris*. **PLoS ONE** 13(2): February 26, 2018.

GOMES, K. S.; MAITAN-ALFENAS, G. P.; ANDRADE, L. G. A.; FALKOSKI, D. L. L.; GUIMARÃES, V. M.; ALFENAS, A. C.; REZENDE, S. T. Purification and Characterization of Xylanases from the Fungus *Chrysosporthe cubensis* for Production of Xylooligosaccharides and Fermentable Sugars. **Appl Biochem Biotechnol**, Dec, 2016.

GUPTA, V. K.; KUBICEK, C. P.; BERRIN, J.G.; WILSON D. W.; COUTURIER, M.; BERLIN, A.; FILHO, E. X. F.; and EZEJI, T. Fungal Enzymes for Bio-Products from Sustainable and Waste Biomass. **Trends in Biochemical Sciences**, Vol. 41, No. 7, July 2016.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227, 680–685, 1970.

MAITAN-ALFENAS, G.P.; VISSER, E.M.; GUIMARÃES, V.M. Enzymatic hydrolysis of

lignocellulosic biomass: converting food waste in valuable products. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, p. 44-49, 2015.

MENEZES, B. S. Produção de xilooligosacarídeos a partir de resíduos lignocelulósicos e fungos filamentosos. 2018. 220 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 2018.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytica Chemistry**, 31, 426–430, 1959.

POLIZELI, M. L. T. M., RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

VISSER, E. M.; FALKOSKI, L.; ALMEIDA, M. N.; MAITAN-ALFENAS, G. P.; and GUIMARÃES, V. M. Production and application of an enzyme blend from *Chrysosporthe cubensis* and *Penicillium pinophilum* with potential for hydrolysis of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, 144, p. 587–594, 2013.

WU, B.; YU, Q.; CHANG, S.; PEDROSO M. M.; GAO, Z.; HE, B.; SCHENK, G. Expansin assisted bio-affinity immobilization of endoxylanase from *Bacillus subtilis* onto corncob residue: Characterization and efficient production of xylooligosaccharides. **Food Chemistry**, 282, p.01–108, 2019.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

## IMPACTO DA TOLERIZAÇÃO POR ZEÍNA NAS PROPRIEDADES BIOMECÂNICAS EM TÍBIAS DE RATOS WISTAR EM FASE FINAL DE RECUPERAÇÃO PÓS-LESÃO

Costa B. H.<sup>1</sup>; Silva R. S. R.<sup>1</sup>; Peixoto I. O.<sup>1</sup>; Costa P. H.M.<sup>1</sup>; Almeida J. M.<sup>1</sup>; Costa R. A.<sup>1</sup>; Penoni A. C. O.<sup>1</sup>; Silva M. A.<sup>1</sup>; Shimano A.C.<sup>2</sup>, Carvalho C. R.<sup>2</sup>; Alvarenga E. L. F. C<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Laboratório de Biologia do Reparo e Nanomateriais - Universidade Federal de São João del-Rei, Departamento de Ciências Naturais

<sup>2</sup> Laboratório de Bioengenharia - Universidade da Cidade de São Paulo, Departamento de Bioengenharia

<sup>3</sup> Laboratório do Sistema Linfóide e Regeneração - Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Morfologia /Ciências Biológicas

E-mail: [brunocostaufsj@gmail.com](mailto:brunocostaufsj@gmail.com)

### 1. Introdução

A matriz orgânica dos ossos é produzida por células especializadas denominadas osteoblastos os quais produzem proteínas no microambiente ósseo como o colágeno, este apresenta capacidade de formar fibras que conferem resistência a tração, atribuindo aos ossos certa flexibilidade tornando-os menos quebradiços[1,2,3].

Após a calcificação da matriz orgânica pela deposição dos nanocristais de Hidroxiapatita (constituídos por fosfato de cálcio + hidróxido de cálcio) ao longo das fibras de colágeno, os ossos adquirem também rigidez, que permite uma maior resistência a compressão [4].

Outra importante célula do tecido ósseo é o osteoclasto. Esta célula realiza a reabsorção da matriz óssea liberando substâncias como íons hidrogénio (H<sup>+</sup>) e proteases. [8,7].

O equilíbrio entre a atividade de reabsorção realizada pelos osteoclastos e a atividade de deposição de matriz orgânica pelos osteoblastos, mantém o processo de remodelamento ósseo constante, tendo este equilíbrio um papel importante no reparo de lesões ósseas [5, 6, 8].

O reparo das lesões ósseas normalmente ocorre ao longo de 3 fases que se sobrepõe: Inflamação, reparo e remodelamento.

Durante a fase inflamatória há formação de hematoma, com migração de células inflamatórias. Estas células produzem citocinas e quimiocinas que regulam a inflamação e influenciam diretamente as fases seguintes [8,9,10].

Estudos realizados mostram que a ausência de TNF e IL6 produzidos pelas células inflamatórias pode retardar a diferenciação de células tronco mesenquimais (MSC) esqueléticas [11,12,13]. Por outro lado uma inflamação exacerbada pode acarretar em falha no processo de reparo [14].

Conhecido a mais de 100 anos e associado a alterações no perfil inflamatório o fenômeno chamado “Tolerância Oral” vem sendo estudado e apresentando resultados satisfatórios[15].

Este processo fisiológico consiste em induzir uma baixa responsividade imunológica a um antígeno administrado por via oral (tolerização) e posteriormente inoculado por via parenteral (Imunização). Sabe-se então que, a ingestão prévia de um determinado tipo de

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

antígeno, pode gerar uma supressão parcial da resposta imune quando ocorre exposição ao mesmo por outra via [15,16].

Estudos mostram que a tolerização seguida de imunização com a proteína ovalbumina (proteína do ovo), e com a proteína zeína (proteína do milho) acarreta em melhora no reparo de feridas excisionais e incisionais de pele em camundongos. [18,19].

Sendo assim, este trabalho teve por objetivo estudar no processo de reparo de defeito ósseo em tíbias de ratos *Wistar* machos os efeitos biomecânicos sistêmicos da tolerância oral induzida após imunização *i.p.* com “zeína”.

## 2. Materiais e métodos

Foram utilizados 18 animais com 12 semanas de vida. O projeto foi aprovado pelo CEUA com número de protocolo 054/2017.

A tolerização foi feita através da ração que já tinha em sua composição a proteína zeína. Os grupos de trabalho foram:

1) *Grupo Zeína (Zn)* A imunização foi realizada com uma injeção intraperitoneal de 0,50 ml de 60ug zeína acrescido 9,6 mg de  $Al(OH)_3$  imediatamente antes do processo cirúrgico.

2) *Grupo Controle  $Al(OH)_3$ (Al)*: O grupo controle  $Al(OH)_3$  recebeu 9,6 mg de  $Al(OH)_3$  via injeção intraperitoneal imediatamente antes do processo cirúrgico.

3) *Grupo Controle Salina (SAL)*: O grupo controle salina recebeu salina via injeção intraperitoneal imediatamente antes do processo cirúrgico.

Foi realizada uma osteotomia parcial (2,0 mm) no terço médio da região medial da tíbia direita. Para esse procedimento foi utilizado um motor de baixa rotação (MicroMotor 210/ 105L, Strong®), usado na Odontologia, acoplado a uma broca cilíndrica cortante 0,34 mm (PM 699, Jet® Carbide Burs). Para a realização dessa cirurgia os animais foram anestesiados com uma associação de Xilazina e Ketamina intraperitoneal. Após isso foi realizada tricotomia e assepsia da região cirúrgica. Em seguida, foi determinado o terço médio da

região medial da tíbia direita e então foi realizada uma incisão longitudinal de aproximadamente 1 cm e afastamento da pele com uso de afastadores. Com o osso exposto, foi realizada a osteotomia parcial. Esse procedimento foi realizado com irrigação constante de soro fisiológico estéril para neutralizar o aquecimento do osso na área de corte. Após produzido o defeito ósseo, a pele foi suturada com fio não absorvível - Nylon 4.0. Terminada a sutura, foi feita a assepsia local com Iodo Povidine (GUERINO et al., 1995; RISO et al., 2010).

Após a cirurgia os animais receberam injeção de antibiótico (Enrofloxacin / 100mg) e em todos os grupos, foi avaliada a qualidade de cicatrização e recuperação tecidual, com injeção diária.

Os animais foram eutanasiados com 28 dias após defeito ósseo. Após Eutanásia foram extraídas das patas direita (com lesão) e esquerda (sem lesão)

*Densitometria:* Para as análises de densitometria óssea (DMO) os ossos foram colocados em recipiente com água e em seguida o recipiente foi colocado no aparelho LUNAR, modelo DPX-IQ, as imagens do raio X de cada osso, bem como análise da região da lesão foram obtidas e enviadas a um computador.

*Teste de flexão biapoiada:* Para este ensaio foram medidos todos os ossos com a utilização de um paquímetro, o valor médio obtido foi de 43,9 mm com desvio padrão de 1,720420 mm. Após isso as epífises distais de cada osso foram incluídas em resina acrílica autopolimerizável enquanto a epífise proximal (local onde se encontrava a lesão) ficou livre. Material foi então submetido ao teste feito pelo aparelho EMIC, modelo DL/1000, o equipamento permite aplicar uma força diretamente na região da lesão, sendo aumentada gradativamente até que o osso se rompa nessa região, os dados são capturados e transmitidos a um computador. O teste nos permite avaliar os parâmetros de força máxima, rigidez relativa e deformação.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

As análises estatísticas foram feitas através de teste ANOVA e pós teste Student Newman-Keuls-  $p \leq 0,05$ .

### 3. Resultados e discussão

Os resultados obtidos com o ensaio de densitometria óssea (DMO) (Fig1) não mostram diferenças significativas entre os grupos tratados com lesão e os grupos tratados intactos. Uma vez que a DMO é normalmente utilizada como medida central da qualidade óssea para estabelecer o risco de fraturas [20], podemos inferir que os grupos com lesão apresentam resistência semelhante a dos grupos intactos.

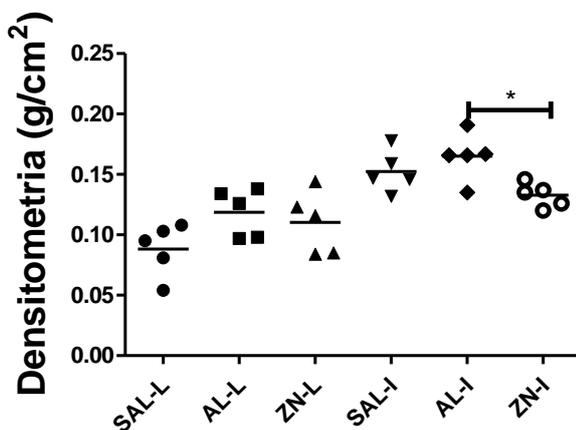


Figura 1 – Representação gráfica dos dados obtidos no ensaio de densitometria mineral óssea.

Os dados do gráfico de força máxima (Fig2) também não apresentaram diferenças entre os grupos. Este parâmetro apresenta a força máxima suportada até o momento da fratura em Newton (N) [21]. Assim observamos que os grupos com lesão e sem lesão suportam aproximadamente a mesma carga.

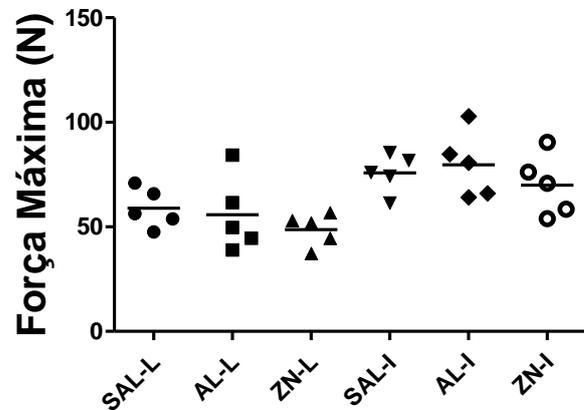


Figura 2 – Representação gráfica dos dados de força máxima obtidos no ensaio de flexão biapoiada.

Tanto a rigidez quanto a deformação (Fig 3 e 4) estão relacionadas com limites elásticos e plásticos do material. Limite elástico mostra o quanto o material consegue se deformar ao ser submetido a uma força e retornar ao seu estado inicial sem resíduos de deformação e o limite plástico vem após excedermos o limite elástico e ao ser cessada a força o material mantém um resíduo de deformação [21]. Se o limite plástico for ultrapassado, o material se rompe. A rigidez mostra a resistência a deformação que o material apresenta, espera-se que um material mais rígido apresente um menor limite elástico e plástico, ou seja, se deforme menos.

O grupo zeína com lesão (ZN-L) apresentou-se com menor capacidade de deformação e mais rígido em relação ao grupo zeína intacto (ZN-I). Isso nos permite observar que ZN-L se apresenta menos flexível que ZN-I, visto que nos ossos a propriedade de flexibilidade é atribuída as fibras colágenas, inferimos que houve menor deposição de colágeno durante o processo de reparo neste grupo. Porém o fato do mesmo grupo ter se apresentado mais rígido em relação a ZN-I e ter suportado uma carga de força semelhante a todos os outros nos permitiria em um caso clínico por exemplo submeter um paciente a maiores pressões em exercícios.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

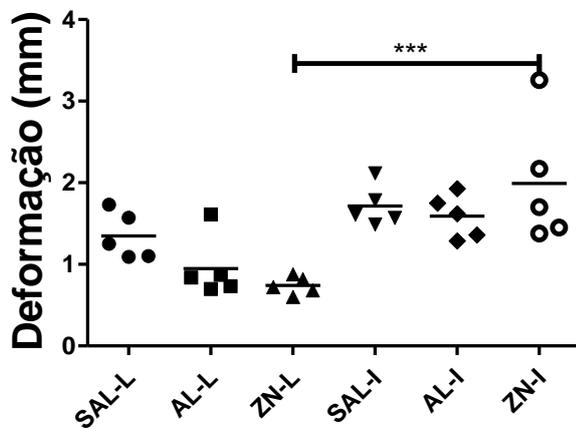


Figura 3 – Representação gráfica dos dados de deformação obtidos no ensaio de densitometria mineral óssea.

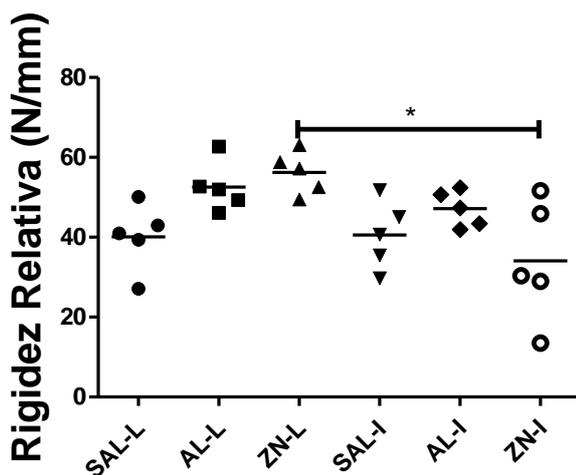


Figura 4 – Representação gráfica dos dados de rigidez relativa obtidos no ensaio de densitometria mineral óssea.

#### 4. Considerações Finais

Concluimos que a tolerização e imunização com zeína pode influenciar no processo de reparo ósseo alterando provavelmente o processo de deposição de fibras colágenas e acelerando o processo de mineralização. Contudo, os experimentos se encontram em fase inicial, sendo necessário estudo histomorfométrico da região lesionada com 28 e 45 dias após a lesão.

#### Referências Bibliográficas

[1] DANGELO, J. G.; FATTINI, C. C. Anatomia sistêmica e segmentar. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2007

[2] MARTIN, R. B.; BURR, D. B.; SHARKEY, N. A. Skeletal tissue mechanics. New York, 1998.  
 [3] COWIN, S.C. Structural adaptation of bones. Applied Mechanics Reviews. Rev. Appl. Mech., v.43, Maio, 1990.  
 [4] Angela. A. Biomechanical properties of 3D-printed bone models. Rev. BioSystems, vol. 176, Janeiro, 2019.  
 [5] CAPULLI, M.; PAONE, R.; RUCCI, N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. Rev. Arch. Biochem. Biophys, vol. 561, Novembro, 2014;  
 [6] COWIN, S. C.; HEGEDUS, D. H.; Bone remodeling I: A theory of adaptive elasticity. Journal of Elasticity, vol. 6, Julho, 1976.  
 [7] BUO, A.; M.; JOSEPH, P. S. Gap junctional regulation of signal transduction in bone cells. Rev. FEBS letters, vol. 588 (8), Janeiro, 2014.

[8] TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. *Princípios de Anatomia e fisiologia*. Guanabara Koogan, 14. Ed, 2016.

[9] LOI, F.; CORDOVA, L.A.; PAJARINEN, J.; LIN. H.; YAO, Z.; GOODMAN, S. B. Inflammation, fracture and bone repair. Rev. Bone., vol. 86, Março, 2016.

[10] EINHORN, T. A. & GERSTENFELD, L. C. Fracture healing: mechanisms and interventions-Nat. Rev. Rheumatol. Janeiro, 2015.

[11] GERSTENFELD, L.C.; et al. Impaired fracture healing in the absence of TNF- $\alpha$  signaling: the role of TNF- $\alpha$  in endochondral cartilage resorption. Bone Miner. Res. Vol 18, 2003.

[12] YANG X, et al. Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice-6. Bone. vol.41. 2007.

[13] GLASS GE, et al. TNF- $\alpha$  promotes fracture repair by augmenting the recruitment and differentiation of muscle-derived stromal cells. Proc. Natl Acad. Sci. EUA. Vol.108, 2011.

[14] OLIVEIRA, C. C.; BORBA, V. Z. C. Epidemiology of femur fractures in the elderly and cost to the state of Paraná, Brazil. Rev. Acta ortop. bras. [online]. vol. 25(4), Agosto, 2017.

[15] WANG, X.; SHERMAN, A.; LIAO, G.; LEONG, K. W.; DANIELL, H.; TERHORST, C. HERZOG, R.W.; Mechanism of Oral Tolerance Induction to Therapeutic Proteins. Rev. Adv. Drug Deliv., vol. 65(6), junho, 2013.

[16] PABST, O.; MOWAT, A.M.; Oral tolerance to food protein. Rev. Mucosal Immunol, vol. 5, Fevereiro, 2012.

[18] CANTARUTI, T.A.; COSTA, R.A.; SOUZA, K.S.; VAZ, N.M.; CARVALHO, C.R. Indirect effects of immunological tolerance to a regular dietary protein reduce cutaneous scar formation. Rev. Immunology, vol. 151(3), julho, 2017.



## II SIMPÓSIO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA



Universidade Federal  
de São João del-Rei

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

---

[19] COSTA, R.A.; MATOS, L.B.; CANTARUTI, T.A.; DE SOUZA, K.S.; VAZ.; N.M.; CARVALHO, C.R. Systemic effects of oral tolerance reduce the cutaneous scarring. *Rev. Immunobiology*, vol. 221 (3), Março, 2016.

[20] Hart, N.H.; NIMPHIUS S.; RANTALAINEN, T.; IRELAND, A.; SIAFARIKAS, A.; NEWTON, R.U. Mechanical basis of bone strength: influence of bone material, bone structure and muscle action. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, Vol 17(3), setembro, 2017.

[21] JEPSEN, K.J.; SILVA, M.J.; VASHISHTH, D.; GUO, X.E.; VAN, D.E.R.; MEULEN, M.C.; Establishing biomechanical mechanisms in mouse models: practical guidelines for systematically evaluating phenotypic changes in the diaphyses of long bones. *J Bone Miner Res.*, Vol 30(6), junho, 2015.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

## EXTRAÇÃO DE MODELOS DE CLASSIFICAÇÃO PARA PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS EM CULTURA DE CÉLULAS 3D

Corrêa<sup>1</sup>, B. H. B. C.; Oliveira<sup>1</sup>, G. M. C.; Rabello<sup>1</sup>, L. A.; Fabrino<sup>2</sup>, D. L.; Pereira<sup>3</sup>, M. A.

<sup>1</sup> Universidade Federal de São João del-Rei, Graduando do curso de Engenharia de Bioprocessos.

<sup>2</sup> Universidade Federal de São João del-Rei, Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos.

<sup>3</sup> Universidade Federal de São João del-Rei, Departamento de Tecnologia em Engenharia Civil, Computação e Humanidades.

E-mail: brenoboos@hotmail.com

### 1. Introdução

Métodos que visam o aprimoramento da busca pela veracidade e reprodução dos experimentos na ciência são constantes. Os eventos de retratação de pesquisas científicas, cada vez mais frequentes, sugerem que o erro, o falseamento de dados, a omissão e a manipulação de detalhes dos experimentos ameaçam a qualidade das evidências que embasam as publicações (DUDZIAK, 2018).

Uma das características dos trabalhos científicos nas áreas biológicas é a grande variabilidade de protocolos usados e o impacto que pequenas mudanças nestes protocolos têm nos resultados experimentais (DUDZIAK, 2018). Pode-se, por exemplo, fazer o mesmo experimento alterando-se apenas o tempo de interação entre componentes biológicos e seus substratos, e os resultados podem ser completamente diferentes. Este trabalho visa propor novas formas de verificação de padrões metodológicos e realizar sugestão daquela configuração que venha a ser a mais adequada a ser usada em determinado experimento. Para tal, pretende-se elaborar uma estrutura de análise de dados através da modelagem computacional que seja capaz de identificar padrões experimentais, buscando identificar configurações comuns entre eles, além de permitir inferir quais são as categorias de resultados esperados.

A modelagem é baseada numa ferramenta computacional de *Data Mining*. Esta ferramenta deverá atuar em uma base de dados a qual compila uma série de estudos clínicos e

experimentais (WITTEN, I. H. e FRANK, E., 2005). A referida base foi obtida a partir de um conjunto de artigos científicos relacionados a experimentos em cultura de células 3D. Trabalhos de diferentes grupos de pesquisas, publicados em revistas técnicas relevantes, foram coletados e tabulados num repositório, a fim de que ferramentas consagradas de mineração de dados pudessem ser aplicadas para se identificar quais são as combinações de parâmetros de protocolos experimentais utilizados no estudo de culturas de células 3D.

Um conceito muito difundido e equivocado define os sistemas de *Data Mining* como fontes para extração automática de todos os conceitos mais valiosos que estão escondidos em um grande banco de dados, sem intervenção ou direcionamento humano (CORTES, 2012; KAMBER, 2012). Para confrontar esta ideia os principais conceitos aceitos por muitos pesquisadores referem-se à descoberta de conhecimento em bases de dados como um processo global de descoberta, que envolve seleção, pré-processamento, mineração dos dados, interpretação dos resultados e a transformação do conhecimento. Sendo assim, a extração de modelos de classificação é uma das etapas deste processo, na qual são aplicados algoritmos específicos para identificação de padrões a partir dos dados (SCHUCH, 2010).

Na engenharia de tecidos é importante o entendimento das propriedades do colágeno, componente majoritário da matriz extracelular nativa. É um dos biomateriais mais utilizados

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

para a fabricação de *arcabouços de sustentação* para engenharia tecidual, e que retêm sinais informativos que promovem a adesão, diferenciação e proliferação celular (O'BRIEN, 2011).

O sistema WEKA, um software de código aberto, foi selecionado para a busca dos padrões, pois possui como um dos pontos fortes a extração de modelos classificadores de dados (WITTEN E FRANK, 2005). Um modelo de classificação é utilizado para identificar a classe à qual pertence uma determinada amostra de uma base de dados, a partir de seus atributos (HAN, J. e KAMBER, M., 2006).

De acordo com Han e Kamber (2006), a classificação em bases de dados é um processo composto por duas fases: aprendizado e teste. Na fase de aprendizado, um algoritmo busca identificar um modelo classificador, tendo como referência um conjunto de dados de treinamento. Em seguida, o modelo obtido deve ser aplicado em um conjunto de dados de teste a fim de medir a eficácia do modelo gerado. Os conjuntos de treinamento e de teste correspondem a subconjuntos de observações selecionadas de maneira aleatória a partir da base de dados que se deseja analisar. Cada observação do conjunto de treinamento é caracterizada por dois tipos de atributo: o atributo classe, que indica a classe a qual a observação pertence; e os atributos preditivos, cujos valores serão analisados para que seja descoberto o modo como eles se relacionam com o atributo classe (BERRY, M. L. A. e LINOFF, G., 2004).

Após o classificador ser construído, inicia-se a etapa de teste. Na qual o modelo de classificador gerado deve ser avaliado, utilizando-se para tal um conjunto de dados de teste, cujas amostras não estiveram no conjunto de dados utilizados na etapa de treinamento (WITTEN, I. H. e FRANK, E., 2005). O conjunto de teste contém observações que também são selecionadas aleatoriamente a partir da base de dados. No entanto, estas observações devem ser

diferentes das que foram selecionadas para compor o conjunto de treinamento. A acurácia do classificador representa a porcentagem de observações do conjunto de teste que são corretamente classificadas por ele. Caso a acurácia seja alta, o modelo de classificação é considerado eficiente e pode ser utilizado para classificar novos casos.

## 2. *Materiais e métodos*

O processo de preparação dos dados para a extração de regras de classificação, também chamado de pré-processamento (KAMBER, 2012), consiste principalmente em quatro etapas: limpeza, integração, transformação e redução dos dados. Nesse sentido, uma das primeiras atividades foi obter uma visualização dos dados, de forma que se possa ter uma visão geral, para depois decidir quais técnicas deveriam ser aplicadas.

Para o presente trabalho foi gerada uma base a partir de 50 artigos científicos sobre *arcabouços de sustentação* de colágenos e interação com células. Os parâmetros relevantes utilizados nos experimentos para o detalhamento da base de dados foram: origem do colágeno, concentração do colágeno, massa do colágeno, molécula adicional, massa da molécula adicional, massa do *scaffold*, ácido solvente utilizado, concentração do ácido solvente utilizado, parâmetros de liofilização como taxa de resfriamento, pressão, tempo e temperatura, parâmetros envolvidos na reticulação química como o tipo de agente reticulante A e B, bem como a concentração, volume utilizado, tempo de exposição e temperatura de ambos, parâmetros envolvidos na reticulação física como temperatura, pressão e tempo, e algumas características físicas como tamanho do poro esperado, viabilidade celular, inócuo celular e tipo celular.

As buscas dos artigos científicos foram realizadas em cinco sites de busca de artigos científicos: Periódicos CAPES, Periódicos CAPES com resultados expandidos, PubMed, Science Direct e Scopus. Não foram aplicados

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

limites de tempo de publicação para a escolha dos artigos. O principal critério de inclusão foi à utilização de filtros de palavras-chaves: *Collagen*, *Scaffold*, *Cell Culture* e *Vero Cells*. Para cada um dos artigos coletados, cada um dos parâmetros dos experimentos foi identificado e registrado na base de dados.

A seguir, as informações do banco de dados foram transferidas para arquivos de entrada no formato ARFF. O algoritmo árvore de decisão J48 foi utilizado para a obtenção do modelo de classificação.

### 3. Resultados e discussão

O algoritmo J48, proposto por QUINLAN (1993), é considerado o que apresenta o melhor resultado na montagem de árvores de decisões, a partir de um conjunto de dados de treinamento dentro do WEKA. Para a montagem da árvore, ele utiliza a abordagem de dividir-para-conquistar, onde um problema complexo é decomposto em subproblemas mais simples, aplicando recursivamente a mesma estratégia a cada subproblema, dividindo o espaço definido pelos atributos em subespaços, associando-se a eles uma classe (WITTEN E FRANK, 2005).

Um dos aspectos levados em consideração para a sua grande utilização é que o mesmo se mostra adequado para os procedimentos, envolvendo as variáveis qualitativas contínuas e discretas presentes nas bases de dados. Tais características correspondem ao perfil de dados encontrados na área das ciências biológicas, entretanto, esse tipo de abordagem computacional na literatura biológica ainda é incipiente. A seguir, a árvore de decisão gerada para a classificação do tipo de agente reticulante é representada na Figura 1. O classificador do ácido solvente utilizado é apresentado na Figura 2 e o classificador do tipo celular na Figura 3.

Note-se que a árvore apresenta em sua raiz os atributos mais relevantes para a classificação das amostras. Na Figura 1 é possível notar que a origem do colágeno é o atributo mais relevante para a classificação.

```
origem = ? : glutaraldeido (0.0)
origem = Traqueia_bovina: tris_hidroximetil_aminometano (1.21/0.21)
origem = Tendao_de_arquiles_bovino
| tipo_celular = fibroblasto_humano
| tamanho_poro <= 121.6: EDC_NHS_COOH (2.15/0.48)
| tamanho_poro > 121.6: glutaraldeido (2.19/0.26)
| tipo_celular = celulas_tronco_mesenquimais
| conc_agente_reticulante_b = ? : N_dimetilaminopropil (0.0)
| conc_agente_reticulante_b = 0.02_01: EDC_NHS_COOH (2.97)
| conc_agente_reticulante_b = 0.06_01: N_dimetilaminopropil (0.0)
| conc_agente_reticulante_b = 0.024_01: EDC_NHS_COOH (0.21)
| conc_agente_reticulante_b = 0.15_01: N_dimetilaminopropil (0.0)
| conc_agente_reticulante_b = 0.63_100: N_dimetilaminopropil (4.0)
| tipo_celular = celulas_extraidas_de_pele_de_rato: EDC_NHS_COOH (0.0)
| tipo_celular = fibroblatos_embriionarios_de_ratos: EDC_NHS_COOH (0.0)
| tipo_celular = fibroblatos_venenosos_humanos: EDC_NHS_COOH (0.0)
| tipo_celular = celulas_endoteliais_humanas: EDC_NHS_COOH (0.0)
| tipo_celular = MSCs_humanas_da_medula: EDC_NHS_COOH (0.0)
| tipo_celular = tenocitos_equninos: EDC_NHS_COOH (5.38)
| tipo_celular = celulas_tronco: EDC_NHS_COOH (0.0)
origem = Skin_of_eweever: EDC (1.21/0.21)
origem = Derme_bovina: glutaraldeido (0.0)
origem = bovino_tipo_I: formalina (1.21/0.21)
origem = bovino_tipo_I_tendao: glutaraldeido (2.41/0.07)
origem = cartilagem_articular_fetal_bovina: tris_hidroximetil_aminometano (1.21/0.21)
origem = suina: glutaraldeido (0.0)
origem = e_coli_recombinante: glutaraldeido (6.03/0.17)
origem = tendao_de_calda_de_rato: glutaraldeido (0.0)
origem = peixe: glutaraldeido (0.0)
origem = pele_de_salmao: N_dimetilaminopropil (4.83/0.83)
```

Figura 1 – Árvore de decisão para escolha do agente reticulante A com as instâncias classificadas corretamente em 97.14%.

```
concentracao_acido_solvente <= 0.1: acido_acetico (10.29/1.0)
concentracao_acido_solvente > 0.1: acido_hialuronico (5.71/0.71)
```

Figura 2 – Árvore de decisão para escolha do ácido solvente utilizado com as instâncias classificadas corretamente em 95.85%.

```
concentracao <= 8
| agente_reticulante_a = ? : celulas_tronco_mesenquimais (0.0)
| agente_reticulante_a = tris_hidroximetil_aminometano: MSCs_humanas_da_medula (0.83/0.16)
| agente_reticulante_a = EDC_NHS_COOH: tenocitos_equninos (3.72/0.72)
| agente_reticulante_a = N_dimetilaminopropil: celulas_tronco_mesenquimais (9.93)
| agente_reticulante_a = glutaraldeido
| | concentracao <= 1.57: celulas_tronco_mesenquimais (2.15/1.0)
| | concentracao > 1.57: fibroblasto_humano (6.54/1.54)
| agente_reticulante_a = formalina: celulas_tronco_mesenquimais (0.0)
| agente_reticulante_a = EDC: fibroblatos_embriionarios_de_ratos (0.83/0.16)
concentracao > 8
| origem = ? : fibroblatos_embriionarios_de_ratos (0.0)
| origem = Traqueia_bovina: fibroblatos_embriionarios_de_ratos (0.0)
| origem = Tendao_de_arquiles_bovino: fibroblatos_embriionarios_de_ratos (0.0)
| origem = Skin_of_eweever: fibroblatos_embriionarios_de_ratos (0.33)
| origem = Derme_bovina: fibroblatos_embriionarios_de_ratos (0.0)
| origem = bovino_tipo_I: celulas_tronco_mesenquimais (0.33)
| origem = bovino_tipo_I_tendao: fibroblatos_embriionarios_de_ratos (0.0)
| origem = cartilagem_articular_fetal_bovina: MSCs_humanas_da_medula (0.33)
| origem = suina: fibroblatos_embriionarios_de_ratos (0.0)
| origem = e_coli_recombinante
| | tamanho_poro <= 30: celulas_endoteliais_humanas (3.0)
| | tamanho_poro > 30: fibroblatos_venenosos_humanos (2.0)
| origem = tendao_de_calda_de_rato: fibroblatos_embriionarios_de_ratos (4.0)
| origem = peixe: celulas_extraidas_de_pele_de_rato (2.0)
| origem = pele_de_salmao: fibroblatos_embriionarios_de_ratos (0.0)
```

Figura 3 – Árvore de decisão para escolha do ácido solvente utilizado com as instâncias classificadas corretamente em 94.44%.

Na sequência surge o tipo celular. Posteriormente, empatados surgem o tamanho do poro e a concentração do agente reticulante B. Já na Figura 2 a árvore de decisão é baseada apenas no atributo concentração do ácido solvente. Na Figura 3 é possível notar que para uma concentração de colágeno menor ou igual a 8% o atributo preditivo mais relevante é o agente reticulante A. Já para uma concentração

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

do colágeno maior que 8% o atributo preditivo é a origem do colágeno.

As instâncias classificadas corretamente foram 97.14%, 95.85% e 94.44%, respectivamente, nas árvores apresentadas nas Figuras 1, 2 e 3. O desempenho é calculado pedindo ao classificador que dê o melhor palpite sobre a classificação de cada instância no conjunto de testes. Em seguida, as classificações previstas são comparadas às classificações reais para determinar a precisão.

Apesar da quantidade ainda pequena de artigos usados para compor o banco de dados, os resultados foram satisfatórios.

Devido a grande assertividade dos métodos de classificação, pesquisadores de diversas áreas utilizam esta ferramenta como forma de padronizar metodologias que auxiliem na tomada de decisões. Bertsimas e colaboradores (2019) utilizaram árvores de classificações ideais (OCTs), que são novos classificadores de aprendizado de máquina, para aprimorarem a precisão das regras da Rede de Pesquisa Aplicada em Cuidados Pediátricos de Emergência, visando otimizar as operações por meio do melhor desempenho preditivo.

#### 4. Considerações Finais

Este trabalho gera uma contribuição inovadora, uma vez que este tipo de técnica da bioinformática nunca foi utilizado para a classificação de protocolos experimentais em cultura de células 3D. Os valores significativos das instâncias classificadas corretamente demonstraram que a integração de ferramentas matemáticas e computacionais para a análise do corpo de dados que a literatura disponibiliza sobre o assunto *arcabouços de sustentação* de colágenos e interação com células, pode trazer vantagens como menor custo e menor gasto laboratorial, uma vez que a utilização dessa técnica possibilitará monitoramento das variáveis aplicadas nos trabalhos para permitir a melhor escolha de protocolos a serem testados em laboratório.

#### 5. Referências

BERRY, M. L. A. e LINOFF, G., *Data Mining Techniques: for Marketing, Sales and Customer Relationship Management*, John Wiley Consumer, 2nd edition, 2004.

BERTSIMAS D., DUNN J., STEELE D.W., TRIKALINOS T.A., WANG Y., Comparison of Machine Learning Optimal Classification Trees With the Pediatric Emergency Care Applied Research Network Head Trauma Decision Rules. *JAMA Pediatr.* Published online May 13, 2019.

CORTES, S. da C.; PORCARO, R. M.; LIFSCHITZ, S. *Mineração de dados - funcionalidades, técnicas e abordagens*. PUC, 2002.

DUDZIAK, E.A. *Crise na Ciência ou Crise na Reprodutibilidade de Pesquisas?* São Paulo: SIBiUSP, 2018. Disponível em: <<https://www.sibi.usp.br/?p=28441>> Acesso em: 12 de agosto de 2019.

HAN, J. e KAMBER, M., *Data Mining: Concepts and Techniques*, Morgan Kaufmann Publishers, 2nd edition, 2006.

KAMBER, M.; HAN, J.; PEI, J. *Data mining: Concepts and techniques*. Elsevier, 2012.

O'BRIEN, Fergal J. *Biomaterials & arcabouços de sustentação for tissue engineering*. *Materials today*, v. 14, n. 3, p. 88-95, 2011.

SCHUCH, R. et al. *Mineração de dados em uma subestação de energia elétrica*. Dincon, 2010.

WITTEN, I. H. e FRANK, E., *Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques*, Morgan Kaufmann Publishers, 2nd edition, 2005.

## AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESFEROIDES PELA TÉCNICA DA GOTA SUSPensa NAS LINHAGENS CELULARES VERO E J774.A1.

Santos<sup>1</sup>, E. F.; Silva<sup>1</sup>, L. C. e Fabrino<sup>2</sup>, D. L.

<sup>1</sup> Universidade de São João del-Rei, Campus Alto Paraopeba, Graduandas do curso de Engenharia de Bioprocessos.

<sup>2</sup> Universidade de São João del-Rei, Campus Alto Paraopeba, Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos – DQBIO

E-mail: danifabrino@ufjs.edu

### 1. Introdução

Cultura de células refere-se a cultivos derivados de células dispersas, obtidas de tecidos, culturas primárias ou de uma linhagem celular (MORAES; AUGUSTO; CASTILHO, 2008). Células de mamíferos são tipicamente cultivadas como monocamada (2D), em uma superfície plana, mais comumente em frascos de cultura, ou placas de Petri, com meio de cultura como fonte de nutrição e temperatura similar a corporal (37°C) (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013).

A cultura de células 2D resulta em um ambiente celular bem controlado e homogêneo, facilita a análise microscópica e trocas de meio de cultivo, além de sustentar a proliferação celular para a maioria dos tipos de células (FENNEMA et al., 2013). Entretanto, diferenças na morfologia celular, polaridade, expressão de receptores, expressão de oncogenes, interação com a ECM (incluindo a membrana basal) e na arquitetura celular global foram observadas entre células cultivadas em 2D e no que é observado *in vivo*.

Assim, mais atenção tem sido dada aos métodos de cultura 3D, pois as células em um ambiente 3D se comportam fundamentalmente diferente das células cultivadas em 2D (BRESLIN; 2013). Muitas das diferenças observadas entre 2D e 3D são devidas a interações diferenciais célula-célula e célula-matriz (FENNEMA et al., 2013).

Há diferentes métodos de cultivo celular em 3D e entre eles está a formação de esferoides, ou seja, células são cultivadas como agregados celulares (LIN; CHANG, 2008). Entre os métodos disponíveis para a formação de um esferoide, destaca-se o método da gota suspensa, por sua relativa simplicidade e alta reprodutibilidade. Nesta técnica uma pequena alíquota contendo uma suspensão de células individualizadas é colocada nos poços presentes em uma placa especial. Tal placa é então invertida e as alíquotas da suspensão celular se transformam em gotas suspensas que são mantidas no lugar devido à tensão superficial. As células acumulam-se na ponta da gota, na interface líquido-ar, e são deixadas proliferar (KELM et al., 2003).

Os esferoides produzidos pelo método da gota suspensa geralmente são compactos e apresentam baixa variabilidade nos tamanhos (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013).

Neste contexto, esse trabalho buscou avaliar o cultivo de duas diferentes linhagens celulares em 3D, a partir da técnica de *gota suspensa*, e avaliar qualidade do processo afim de utilizar os esferoides padronizados para testes de citotoxicidade de fármacos e nanoestruturas, entre outros.

### 2. Material e Métodos

#### 2.1. Estabelecimento de culturas em 2D e 3D

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

Foram utilizadas células das linhagens Vero e J774.A1 (gentilmente cedida pelo Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos – LBqT/IOC-Fiocruz). As células da linhagem VERO foram cultivadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> em meio DMEM, 10 % Soro fetal bovino (SFB) e 2% antibiótico (Penicilina/Streptomomicina). As células da linhagem J774.A1 foram cultivadas nas mesmas condições acima descritas, porém o meio usado foi o RPMI-1640). Ambas as linhagens foram mantidas a 37°C, em incubadora de CO<sub>2</sub> 5%. À confluência de 90% as células foram tripsinizadas (0,025% de tripsina em meio acima descrito, sem soro) e uma suspensão de 2,5x10<sup>6</sup> cels/mL foi preparada para semeadura em placas de 96 poços 2D e 3D.

Placas de 96 poços para culturas 2D e 3D (Perfecta3D©-Biomatrix) foram preparadas com uma população celular inicial de 2,50 x10<sup>5</sup>cels/40µL. As placas 2D foram cultivadas por 48h como controle positivo do desenvolvimento celular. As placas para culturas 3D foram inicialmente preparadas seguindo as orientações de densidade populacional sugeridas pelo fabricante (2,50x10<sup>5</sup>cels/40µL), porém, foi feita uma variação da concentração inicial de semeadura para avaliação da possibilidade do uso de uma menor densidade celular de inicial. Tal variação foi realizada na proporção de 12,5%, partindo de um volume inicial de 40 µL (2,50x10<sup>5</sup>cels) até o volume final de 20 µL, (1,56x10<sup>5</sup>cels). Todos os experimentos foram feitos em triplicata. Os reservatórios de água da placa de cultura 3D foram preenchidos conforme instruções do fabricante e elas foram mantidas a 37°C em incubadora de CO<sub>2</sub> por 48h.

## 2.2. Análises das imagens

As imagens foram obtidas em um microscópio de contraste de fase (Olympus BX41), e foram analisadas utilizando-se o software IMAGEJ versão 1.52a. A área projetada, (A) e o perímetro, (P), foram determinados para cada esferoide analisado. Com os dados obtidos foram calculados o fator

de forma ( $\varphi$ ), o volume (V) e o volume corrigido dos esferoides segundo metodologia empregada por Kelm et al. (2003).

O fator de forma descreve a esfericidade dos agregados ( $\varphi$ ):

$$\varphi = \frac{\pi \times \sqrt{\frac{4A}{\pi}}}{P} \quad (1)$$

O volume esférico do esferoide (V):

$$V = \frac{4\pi}{3} \left(\frac{P}{\pi}\right)^3 \quad (2)$$

E o volume corrigido (V'):

$$V' = \varphi V \quad (3)$$

## 3. Resultados e Discussão

Todas as culturas 2D feitas em paralelo foram bem-sucedidas, indicando a boa qualidade das linhagens celulares.

Após 24 horas da semeadura, os poços que continham a concentração inicial de 1,87 x 10<sup>5</sup> células da linhagem J774.A1 foram os primeiros a exibir os esferoides, tal concentração foi proporcional à sugerida pelo fabricante. Já os poços contendo as mesmas concentrações de células da linhagem Vero só mostraram formação de esferoides no quarto dia de cultivo. Esse maior tempo de formação pode estar relacionado à características específicas da linhagem.

Desta forma foi usada a linhagem J774.A1 para os estudos de cinética de formação do esferoide. por meio de análise das imagens obtidas com 24h, 48h, 6 e 7 dias(d) de cultivo, com população inicial de 1,25x10<sup>5</sup> células por gota, uma vez que essa menor concentração já possibilitou a formação de um agregado celular.

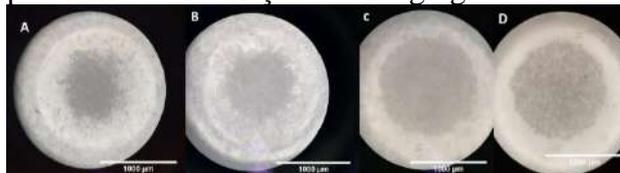


Figura 1: Formação e evolução de esferoides de células da linhagem J774 com inóculo inicial de 1,25x10<sup>5</sup> células e cultivados em RPMI + 10% de SFB+2% de ATBC a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. (A) 24h. (B) 48h. (C) Dia 6. (D) Dia 7. Fonte: próprio autor.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

Nestas imagens foram feitas medidas de área projetada, (A) e perímetro (P) obtidas após tratamento no IMAGEJ e foi possível observar que os esferoides têm um crescimento paulatino e homogêneo como pode ser observado nos dados dispostos na tabela 1.

Tabela 1- Área projetada e perímetro obtidos para o esferoide ao longo do tempo para a linhagem J774.A1.

Tempo	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Perímetro ( $\mu\text{m}$ )
24h	$1,32 \times 10^5$	$1,86 \times 10^3$
48h	$1,67 \times 10^5$	$1,92 \times 10^3$
06d	$2,90 \times 10^5$	$2,18 \times 10^3$
07d	$3,08 \times 10^5$	$2,25 \times 10^3$

Fonte: próprio autor

Por meio das equações anteriormente apresentadas, foram calculados o fator de forma, o volume esférico e o volume corrigido para o esferoide. Foi possível observar que a variação no volume dos esferoides é regular e que seu volume e fator de forma apresentam pouca variação para os dias 6 e 7, indicando uma estabilização no crescimento.

Como mostram os dados da tabela 2, abaixo.

Tabela 2- Fator de forma  $\phi$ , volume esférico V e volume corrigido V', para esferoide ao longo do tempo para a linhagem J774.A1.

Dia	$\phi$	V ( $\mu\text{m}^3$ )	V' ( $\mu\text{m}^3$ )
01	0,6936	$8,65 \times 10^8$	$6,00 \times 10^8$
02	0,7533	$9,61 \times 10^8$	$7,24 \times 10^8$
06	0,8757	$1,40 \times 10^9$	$1,23 \times 10^9$
07	0,8759	$1,53 \times 10^9$	$1,34 \times 10^9$

Fonte: próprio autor.

Objetivando analisar a uniformidade dos esferoides, formados pelo método da gota suspensa, foram analisados três poços com a mesma população inicial de células de  $2,19 \times 10^5$  aos 07 dias de cultivo.

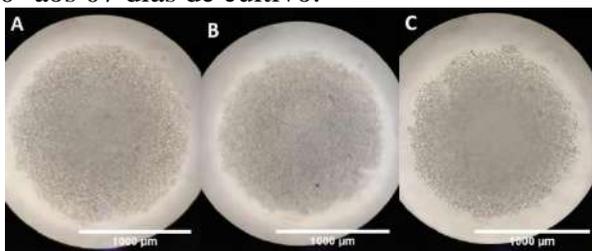


Figura 2: Esferoides de células da linhagem J774 com inóculo inicial de  $2,19 \times 10^5$  células após 7 dias de cultivo em RPMI + 10% de SFB+2% de ATBC a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. (A) Poço E2. (B) Poço E3. (C) Poço E4. Fonte: próprio autor.

Após análise das imagens no software, foram obtidas medidas de área projetada e perímetro. Com estes dados foram calculadas a forma, o volume e o volume corrigido para cada esferoide em estudo. Os resultados estão dispostos nas tabelas 3 e 4, abaixo.

Tabela 3 – Área projetada e perímetro fornecidos pelo IMAGEJ para a linhagem J774.A1.

Poço	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Perímetro ( $\mu\text{m}$ )
E2	$1,85 \times 10^6$	$5,25 \times 10^3$
E3	$1,61 \times 10^6$	$5,22 \times 10^3$
E4	$1,59 \times 10^6$	$4,93 \times 10^3$

Fonte: próprio autor

Tabela 4 – Fator de forma  $\phi$ , volume esférico V e volume corrigido V' calculados para cada esferoide para a linhagem J774.A1.

Poço	$\phi$	V ( $\mu\text{m}^3$ )	V' ( $\mu\text{m}^3$ )
E2	0,9186	$1,95 \times 10^{10}$	$1,79 \times 10^{10}$
E3	0,8597	$1,93 \times 10^{10}$	$1,66 \times 10^{10}$
E4	0,9061	$1,61 \times 10^{10}$	$1,46 \times 10^{10}$

Fonte: próprio autor

O coeficiente de variação do volume corrigido para os esferoides em análise é de 10,16%, indicando que o método produz gotas com baixa variabilidade nos tamanhos. Resultados similares foram encontrados por Kelm et al. (2003), em que o coeficiente de variação do diâmetro foi de 10% a 15% entre 7 e 16 dias de cultivo, para a linhagem HEPG2. Entretanto, são necessários mais testes para obtenção de n amostral significativo.

Os esferoides produzidos para ambas as linhagens celulares empregadas foram comparados com seis dias de cultivo. O inóculo inicial utilizado foi de  $1,87 \times 10^5$  células. O esferoide produzido pela linhagem Vero apresentou volume corrigido de  $8,37 \times 10^{10} \mu\text{m}^3$  com um fator de forma de aproximadamente 0,91. Já o esferoide da linhagem J774.A1, alcançou volume corrigido de  $5,12 \times 10^9 \mu\text{m}^3$  e fator de forma de 0,8613. Os resultados indicam que as células Vero se adaptaram ao cultivo em 3D, pois tiveram alta taxa de multiplicação, mesmo cultivadas em um meio nutricionalmente menos variado, o condiz com a natureza da célula uma vez que a J774.A1 é macrófaga, portanto, menos gregária, já a Vero é epitelial, portanto, mais aderente.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

As gotas suspensas produzidas através da técnica são mantidas no lugar devido à tensão superficial (KELM et al., 2003). Observou-se que os esferoides se desfazem após o sétimo dia de cultivo, para a linhagem J774.A1 e após o oitavo dia para a linhagem Vero, indicando que para este tempo de cultivo o esferoide atinge uma massa maior do que a tensão superficial da gota suporta.

#### 4. Conclusões

Conclui-se que a técnica do esferoide é satisfatória para gerar esferoides homogêneos e maduros com diferentes linhagens celulares, entretanto, é preciso observar que o tempo inicial de formação dos esferoides, para cada linhagem, pode variar, desta forma dependendo da maturidade do esferoide para o ensaio biológico pretendido deve-se estar atento à linhagem escolhida. Porém, uma vez que os esferoides maduros (6 a 7 dias) de ambas as linhagens não exibiram diferenças significativas de homogeneidade, volume ou área, a linhagem celular escolhida pode não ser um fator limitante.

Estudos mais elaborados afim se de obter dados quantitativos acurados sobre os esferoides formados por essa técnica são necessários para a produção de esferoides padronizados para o teste de fármacos e nano estruturas, entre outros testes.

#### 5. Agradecimentos

A autora agradece a FAPEMIG pela assistência financeira dada a este trabalho.

#### 6. Referências bibliográficas

BRESLIN, Susan; O'DRISCOLL, Lorraine. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. **Drug Discovery Today**, [s.l.], v. 18, n. 5-6, p.240-249, mar. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2012.10.003>.  
DUTTA, R.C.; DUTTA, A.K. Cell-interactive 3D-scaffold; advances and applications. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 334-339, 2009.

FENNEMA, Eelco et al. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. **Trends In Biotechnology**, [s.l.], v. 31, n. 2, p.108-115, fev. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.12.003>

KELM, Jens M. et al. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. **Biotechnology And Bioengineering**, [s.l.], v. 83, n. 2, p.173-180, 21 maio 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.10655>.

LIN, Rwei-zhen; CHANG, Hwan-you. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. **Biotechnology Journal**, [s.l.], v. 3, n. 9-10, p.1172-1184, out. 2008. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/biot.200700228>.

MORAES, A.M.; AUGUSTO, E.F.P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica**, 1a Ed. São Paulo: Roca, 2008. 503p.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

## AValiação DA ATIVIDADE ANTIMELANOMA *IN VITRO* DA CURCUMINA EM LINHAGEM CELULARES TUMORAIS

Oliveira, M. A. B. R. e<sup>1</sup>, Baêta, J. V. de P. B. <sup>2</sup>, Santos, A. A. Dos<sup>3</sup>, Hauck, M. de S. <sup>1</sup>, Araújo, F. De O.<sup>1</sup>, Lima, C. F.<sup>4</sup>, Diaz, M. A. N<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Viçosa, Doutoranda de Bioquímica Aplicada.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral.

<sup>4</sup> Instituto Federal de Ciência, Educação e Tecnologia do Pará.

E-mail: maria.e@ufv.br

### 1. Introdução

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) *câncer* é a denominação dada a um conjunto de mais de 100 doenças, tendo como principal característica comum o crescimento desordenado de células capazes de invadir tecidos e órgãos adjacentes, e de se espalharem de forma metastática para outras regiões do corpo. Ainda, os tumores malignos tendem a ser muito agressivos e, muitas vezes se tornam não responsivos aos tratamentos, podendo se espalhar para outras regiões do corpo (COTRAN *et al.*, 2004).

Dentre os diferentes tipos de câncer destaca-se o câncer de pele do tipo melanoma que, apesar de ser o menos incidente, é o que possui o maior índice de mortalidade, considerado assim como um dos cânceres mais agressivos, devido a sua alta propensão a formação de metástase, além da resistência à terapia (RATHORE *et al.*, 2019).

As estimativas para o biênio 2018-2019 no Brasil indicaram a ocorrência de 6.260 novos casos. Desses, foram contabilizados 1.794 óbitos (INCA, 2019).

O medicamento de escolha do Sistema Único de Saúde (SUS) para o tratamento do melanoma é a Dacarbazina. Essa droga apresenta um Índice de Seletividade (IS) próximo de 1,0 (efeito citotóxico do composto em linhagens derivadas de células normais em relação à linhagens derivadas de células tumorais), o qual é considerado baixo,

tornando-a pouco seletiva para células tumorais, podendo atuar em qualquer fase do ciclo celular (BAÊTA, 2019). Apesar de apresentar uma resposta terapêutica muito baixa, o seu uso em quimioterapia ocorre, principalmente, devido ao baixo custo. (FAGHFURI *et al.*, 2015).

Os produtos naturais têm sido considerados como promissores agentes citotóxicos para o câncer devido a vantagens como propriedades de interações com o DNA, fácil disponibilidade, baixa toxicidade e redução do custo de produção. Dentre eles, a Curcumina (diferucoilmetano), um polifenol extraído da planta *Cúrcuma longa* (comumente conhecida como açafrão-da-terra), é conhecida por possuir propriedades anti-inflamatórias e anticancerígenas e tem sido um dos constituintes botânicos mais bem investigados de uso no tratamento de doenças crônicas (TENG *et al.*, 2019). Foi demonstrado, por exemplo que a curcumina mata as células tumorais modulando várias vias de sinalização celular levando à apoptose nas células tumorais (RAVINDRAN *et al.*, 2009, MACKENZIE *et al.*, 2008).

Assim, no presente trabalho, foi feita a avaliação da atividade antimelanoma *in vitro* da Curcumina a fim de observar se tal composto é possuidor de características desejáveis a um novo fármaco, apresentando IC<sub>50</sub> (metade da dose máxima letal) e IS superiores ao valor mínimo considerado

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

significativo em ensaios de novas drogas.

## 2. Metodologia

### 2.1. Crescimento das células *in vitro* (cultivo celular)

A linhagem celular tumoral B16F10, derivada de um melanoma murinho (FIDLER, 1975), foi rotineiramente cultivada em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles Medium*). A linhagem normal Melan-A derivada de melanoblastos epidérmicos normais de camundogos C57BL/6 (BENNETT et al., 1987), foi rotineiramente cultivada em meio de cultura RPMI1640 (*Roswell Park Memorial Institute*). Em todos os meios foram adicionados penicilina 100 U/ml, estreptomicina 0,1 mg/ml e suplementados com 10 % de soro fetal bovino sendo assim denominado meio completo (MC). Os frascos de cultura de poliestireno de cada linhagem foram mantidos em incubadora a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade relativa.

### 2.2. Atividade citotóxica do composto medida pelo ensaio do MTT

Frascos de cultivo contendo cada uma das culturas em monocamada foram tripsinizadas e ressuspensas, em meio de cultura MC. Esta suspensão foi submetida a centrifugação por 5min a 700xg e ressuspensa em MC. Em seguida, foi realizada a contagem de células viáveis em câmara de *Naubauer*. Dados de experimento piloto foram utilizados para a escolha do número de células a serem plaqueadas em cada poço da placa de 96 poços. Assim, as células foram plaqueadas nas concentrações de  $1 \times 10^3$  células/mL e  $1 \times 10^4$  células/mL, para as linhagens tumoral e normal, respectivamente. A cada poço foi adicionado 100 µL de MC e suspensão de células. As placas foram incubadas por 24 horas à 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade em seus respectivos meios de cultura. Após esse período, foram adicionadas diferentes concentrações de Curcumina às células, as quais foram incubadas por 60 horas. As diferentes concentrações de Curcumina

foram obtidas a partir de diluição em série em DMSO e MC, com concentrações entre 6,25µg/mL e 400 µg/mL, de forma que em cada poço a concentração de DMSO não ultrapassasse 0,5%. Para cada concentração do composto e para cada linhagem celular, foram utilizadas cinco repetições (poços) por placa, cada experimento foi repetido 3 vezes. Os controles deste ensaio (100% de células viáveis) foram realizados com meio de cultura contendo 0,5% de DMSO (v/v). O mesmo tratamento foi realizado com a droga Dacarbazina.

Decorrido o período de incubação, o meio contendo as drogas foi removido. A seguir, todos os poços foram lavados com PBS, e a cada um deles foram adicionados 50 µL de uma solução de MTT (3-{4,5- dimetiliazol-2-il}-2,5-difeniltetrazólio bromido) a 0,5 mg/mL. As placas foram novamente incubadas nas condições descritas acima por 4 horas. Após esse período, o MTT foi retirado de todos os poços, e os cristais de formazan foram solubilizados em 100 µL de DMSO. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis em relação ao controle (sem tratamento).

### 2.3. Cálculo da concentração inibitória de 50% das células (IC<sub>50</sub>)

O valor da concentração inibitória de 50% das células (IC<sub>50</sub>) foi calculado por meio de uma regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada (porcentagens de células viáveis), utilizando os programas GraphPad Prism® 5.0 e Microsoft Office Excel 2013®.

### 2.4. Índice de Seletividade

A concentração inibitória de 50% das células (IC<sub>50</sub>) foi calculada para cada linhagem, e serviu para o cálculo do índice de seletividade (IS) do composto. O IS indica a seletividade de um composto entre uma linhagem neoplásica e uma normal, e

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

consequentemente, o potencial uso terapêutico desse composto em testes clínicos. Assim, neste estudo, o IS corresponde à divisão entre o valor da  $IC_{50}$  do composto sobre a linhagem de células normais (Melan-A) e o valor da  $IC_{50}$  do composto sobre a linhagem de células neoplásicas (B16F10).

### 3. Resultados e Discussão

As taxas de mortalidade celular, após a exposição das linhagens normal Melan-A e tumoral B16F10 às diferentes concentrações da curcumina estão representados nos gráficos da figura 1. O valor de  $IC_{50}$  para cada linhagem está apresentado na Tabela 1 bem como o valor do coeficiente de determinação da regressão ( $R^2$ ). Foi possível calcular também os valores de  $IC_{10}$  e  $IC_{90}$ .

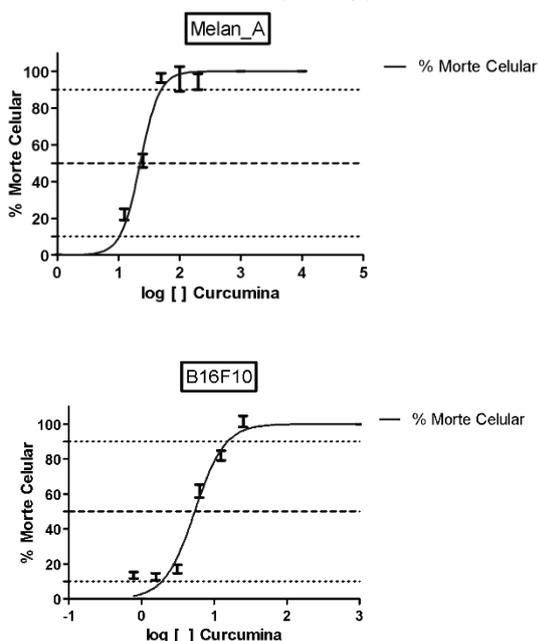


Figura 1 – Taxa de mortalidade celular em função da concentração da Curcumina para as linhagens celulares, após exposição de 60 horas.

No tratamento com curcumina durante o período exposição de 60 horas, observou-se que a linhagem de B16F10, Figura 1, diferentemente das células normais, apresentaram viabilidade celular rigorosamente afetada. Ou seja, tais linhagens celulares são muito sensíveis ao composto em estudo, enquanto as células de linhagens normais não apresentaram tal sensibilidade, o

que representa um resultado promissor, visto que o objetivo de um composto antitumoral eficaz é justamente eliminar células tumorais, sem causar danos agressivos às células normais.

Tabela 1 -  $IC_{50}$  das linhagens de melanoma e normal após tratamento com Curcumina.

	Linhagem celular	
	Melan-A	B16F10
<b>Log<math>IC_{50}</math></b>	1,359	0,7337
<b><math>IC_{50}</math> (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	$22,83 \pm 2,37$	$5,416 \pm 89,9$
<b><math>R^2</math></b>	0,9631	0,9632
<b><math>IC_{10}</math></b>	11,69	1,64
<b><math>IC_{90}</math></b>	46,76	18,52

A partir dos dados da Tabela 1, percebe-se que para a linhagem normal, as concentrações de  $IC_{50}$  de Curcumina,  $22,83 \pm 2,37 \mu\text{g/mL}$ , foi maior que para a linhagem tumoral ( $5,416 \pm 89,9$ ). Em suma, esses dados mostram que a dose mínima letal necessária para matar metade da população de células tumorais é menor que a dose mínima letal para células normais.

Além disso, os valores de  $IC_{50}$  da linhagem de melanoma está em uma faixa de concentração menor que as  $IC_{10}$  da linhagem normal. Ou seja, a concentração que mata 50% da população das células tumorais tem ação citotóxica em menos de 10% das células normais.

A Dacarbazina é um antineoplásico clássico utilizado para o tratamento do câncer do tipo melanoma. Nesse presente estudo foram feitos tratamentos com essa droga para a linhagem de melanoma e linhagem normal a fim de confrontar tais resultados com os dados obtidos do composto neste estudo, e essa comparação se apresenta na Tabela 2.

Tabela 2 -  $IC_{50}$  das linhagens de melanoma e normal após tratamento com Dacarbazina.

	Linhagem celular	
	Melan-A	B16F10
<b>Log<math>IC_{50}</math></b>	2,416	2,504
<b><math>IC_{50}</math> (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	$260,7 \pm 48,6$	$319,4 \pm 89,9$
<b><math>R^2</math></b>	0,8869	0,7645

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

Os dados da Tabela 2 apresentam valores de IC<sub>50</sub> do quimioterápico Dacarbazina, os quais são muito superiores aos encontrados para curcumina. Assim, é reforçada a hipótese de que o composto em estudo apresenta virtudes de um novo fármaco, potencialmente promissor para o tratamento do câncer. A partir dessa avaliação foi possível calcular e comparar os índices de seletividade (IS) da curcumina e do quimioterápico comercial utilizado para o tratamento de melanoma (Tabela 3).

Tabela 3 - Comparação dos IC<sub>50</sub> e Índice de Seletividade da linhagem de melanoma após tratamento com Curcumina e Dacarbazina.

	Composto	
	Curcumina	Dacarbazina
IC <sub>50</sub> B16F10(μg/mL)	5,416 ± 89,9	319,4 ± 89,9
IC <sub>50</sub> Melan-A (μg/mL)	22,83 ± 2,37	260,7 ± 48,6
IS (Melan-A/B16F10)	4,21	0,8162

Com esses resultados, foi possível avaliar a seletividade da Curcumina sobre o melanoma. A avaliação do seu efeito citotóxico em relação ao do fármaco tradicionalmente utilizado revela que ele é um pouco cerca de cinco vezes mais ativo que Dacarbazina contra células do melanoma.

Vale salientar ao final de nossas avaliações que um valor de IS superior a 2 é um forte indicativo de que testes in vivo podem ser iniciados, a fim de averiguar se essa diferença pode favorecer a redução da taxa de desenvolvimento do tumor in situ.

#### 4. Considerações Finais

Os dados obtidos nesse presente trabalho mostram que a dose mínima letal (IC<sub>50</sub>) foi bastante inferior aos valores obtidos para quimioterápicos de uso tradicional. Além disso, os índices de seletividade do composto foram superiores ao valor mínimo considerado significativo (IS = 2,0) pela comunidade

científica em ensaios de novas drogas. Assim, os resultados obtidos nesse estudo revelam que a Curcumina é um potencial medicamento para o tratamento do melanoma.

#### 5. Referências Bibliográficas

- BAËTA, J. V. DE B. **Avaliação da Atividade Antimelanoma in vitro, in vivo e in silico de Derivado de Dibenzoilmetano, DMA<sub>2</sub>**. Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada), Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa-MG, 2019.
- BENNETT, D. C., COOPER, P. J., & HART, I. R. (1987). A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. **International journal of cancer**, 39: 414-418.
- COTRAN, R. S. *et al.* Robbins and Cotran pathologic basis of disease. **Philadelphia: W.B. Saunders Company**, 2004.
- FAGHFURI *et al.* Nivolumab and pembrolizumab as immune-modulating monoclonal antibodies targeting the PD-1 receptor to treat melanoma. **Expert review of anticancer therapy**, 15(9):981-93. Jul 2015.
- FIDLER, I. J. (1975). Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. **Cancer research**, 35(1), 218-224.
- INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. **Estimativa 2018: Incidência do câncer no Brasil**. [Brasília, DF]: INSTITUTO NACIONAL DO C NCER, 2018. Disponível em <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/>. Acesso em 07 jun. 2019.
- RATHORE, M. *et al.* Cancer cell-derived long pentraxin 3 (PTX3) promotes melanoma migration through a toll-like receptor 4 (TLR4)/NF-κB signaling pathway. **Oncogene**, 38:5873-5889. Jun 2019.
- TENG, C. *Et al.* Chemopreventive Effect of Phytosomal Curcumin on Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma in A Transgenic Mouse Model. **Nature**, 9 (1), 2019.
- RAVINDRAN, J. *Et al.* Curcumin and Cancer Cells: How Many Ways Can Curry Kill Tumor Cells Selectively? **AAPS J**, 11, p. 495-510, 2009.
- MACKENZIE, G. G. *et al.* Curcumin induces cell-arrest and apoptosis in association with the inhibition of constitutively active NF-kappaB and STAT3 pathways in Hodgkin's lymphoma cells. **Int. J. Cancer**, 123, p. 56-65, 2008.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

## DETECÇÃO DE ATIVIDADE ANTIVIRAL EM EXTRATOS DE FOLHAS E GALHOS DE *Maytenus* sp. CONTRA O zika virus (ARBOVÍRUS)

Nunes, D. A. F.<sup>1</sup>, Silva, B.M.<sup>3</sup>, Hauck, M.S.<sup>3</sup>, Santos, F. R. S.<sup>1</sup>; Rocha, I. O.<sup>1</sup>, Lopes, G. F. M.<sup>1</sup>; Aguilar, M. G.<sup>2</sup>; Duarte, L. P.<sup>2</sup>, Ferreira, J. M. S.<sup>1</sup>, Magalhães, J. C.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Centro-Oeste Dona Lindu, Laboratório de Microbiologia Médica, Divinópolis, MG, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de química, Instituto de Ciências exatas, Belo Horizonte, MG, Brasil

<sup>3</sup>Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Alto Paraopeba, Laboratório de Microbiologia e Enzimologia, Ouro Branco, MG, Brasil

E-mail: [daminunes@hotmail.com](mailto:daminunes@hotmail.com)

### 1. Introdução

Os arbovírus são vírus de genoma RNA, mantidos em hospedeiros suscetíveis a artrópodes hematófagos nos quais se multiplicam e são passados a novos vertebrados (CALISHER, HIGGS, 2018; VASILAKIS, TESH, 2015).

O vírus causadores de arboviroses podem ser divididos em quatro famílias: Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae e Reoviridae (METZ; PIJLMAN, 2011).

O zika virus (ZIKV) pertence à família Flaviviridae, e foi isolado em macacos *Rhesus* na Uganda em 1947 e em humanos em 1952. A partir daí, foi disseminado para outras regiões do mundo. Em 2015, foi detectado um surto no Brasil sendo espalhado por várias regiões brasileiras (Rodríguez-Morales, 2015; ZANLUCA, et al., 2015). Desse modo, em 2016, o vírus foi incluído na Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública, sendo que entre 2016 e 2018 foram registrados 3.266 casos prováveis de doença pelo vírus no país e até fevereiro de 2019 foram notificados 630 casos de zika em todo o país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

O número de casos pode ser ainda maior devido a subnotificações, pela semelhança com a Dengue. A febre zika normalmente é assintomática, podendo apresentar quadros

leves de febre, erupção cutânea, mialgia e artralgia.

Porém, pode apresentar complicações que afetam o sistema neural e imunológico (MENEZES et al., 2016).

O ZIKV é capaz de atravessar a placenta, atingindo as células progenitoras corticais, prejudicando o desenvolvimento neurológico, podendo levar à microcefalia (CUGOLA et al., 2016).

Também são observados casos de síndrome de Guillain-Barré causada pela desmielinização dos nervos periféricos e espinhais por intensa ação de células mononucleares e linfocíticas (YUKI; HARTUNG, 2012; Cao-Lormeau et al., 2016).

Atualmente, não há vacina para a prevenção da febre zika ou drogas antivirais específicas contra o vírus. Diante disso, a comunidade científica busca novas moléculas antivirais (WEAVER, REISEN, et al., 2010; YASUHARA-BELL, 2010).

O Brasil abriga cerca de 10% da biota mundial estudada, e entre as várias plantas encontradas, a família Celastraceae tem se destacado por suas espécies serem amplamente empregadas na etnofarmacologia e devido à ampla gama de propriedades medicinais e inseticidas a ela atribuídas (DEEPA, BAI, 2010). Esse estudo teve como objetivo avaliar a presença de atividade antiviral contra o zika virus em extratos derivados de folhas e galhos de *Maytenus* sp.

### 2. Material e métodos

#### 2.1. Compostos derivados de *Maytenus* sp.

Os extratos de folhas e galhos de *Maytenus* sp. foram cedidos pelo Grupo de Pesquisa em Plantas Mediciniais da Universidade Federal de Minas

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

Gerais (NEPLAM/UFMG).

## 2.2 Células de mamífero Vero

As células de rim de macaco verde, *Cercopithecus aethiops*, Vero, foram utilizadas para os diferentes ensaios antivirais. Foram mantidas em meio DMEM, com 5% de SFB e um coquetel de antibióticos. As células foram mantidas a 37°C, em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> e foram repicadas em intervalos de 3 dias.

## 2.3. Vírus Zika

As cepas de ZIKV, obtidas da Universidade de São Paulo, foram multiplicadas de acordo com Ferraz e colaboradores (FERRAZ *et al.*, 2019). Resumidamente, o vírus foi multiplicado em células Vero, sendo as culturas infectadas incubadas até o aparecimento de 80-90% de efeito citopático viral (ECP), caracterizado pela formação de sincícios, grumos e desprendimento celular. Posteriormente, o sobrenadante foi clarificado por centrifugação a 4°C, aliquotado e armazenado a -80°C até o uso.

## 2.4. Titulação de vírus

Para determinar a concentração de vírus do estoque trabalho e nos ensaios antivirais, o número de unidades formadoras de placas virais (UFP/mL) foi obtido pelo método de dosagem de placas de Dulbecco (DULBECCO, 1952).

## 2.5. Ensaio de citotoxicidade

Antes dos testes antivirais, os compostos foram submetidos a teste de citotoxicidade, o qual determina a concentração citotóxica para 50% das células (CC<sub>50</sub>). As células foram distribuídas em microplacas de 96 poços e incubadas. No dia seguinte, foram tratadas com concentrações dos compostos e incubadas. Após 48h, pela adição de metil-tiazol-tetrazólio (MTT), foi feita a revelação da % de células viáveis pela equação  $\% = (B \div A) \times 100$ , em que A e B são as absorvâncias ( $\lambda = 540\text{nm}$ ) das células não tratadas e células tratadas, respectivamente.

## 2.6. Ensaio de atividade antiviral global

Foram testadas na atividade antiviral, concentrações dos extratos abaixo da CC<sub>50</sub>. Para isso, células foram distribuídas em microplacas e incubadas por 24h. As diluições dos compostos foram adicionadas juntamente com a suspensão viral (moi = 0,1 vírus/cél) e após 48h, o MTT foi aplicado. A concentração com proteção de 50% das células infectadas (CE<sub>50</sub>) foi calculada como:  $[(A - B) \div (C - B)] \times 10$ , sendo A: densidade ótica (DO) das células tratadas e infectadas, B, das não tratadas e infectadas, e C, das não tratadas e não infectadas. A pesquisa foi feita conforme descrito por Barrow *et al.*, 2016, com algumas modificações.

## 2.7 Análises estatísticas

Inicialmente foi avaliada a normalidade das amostras por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. Para análise estatística, foi utilizado o teste de ANOVA para comparação das médias, seguido de teste de Tukey para comparações múltiplas. Os testes foram analisados pelo software GraphPad Prism® 7.00.288. Foram realizadas triplicatas biológicas, sendo os resultados demonstrados como média  $\pm$  desvio padrão ( $p \leq 0,05$ ).

## 3. Resultados e discussão

### 3.1. Análise do efeito citotóxico em células Vero

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* é utilizado para definir o efeito citotóxico, no qual a substância é capaz de provocar danos às funções básicas da célula (EISEMBRAND *et al.*, 2002).

Na Tabela 1 são apresentadas as concentrações citotóxicas a 50% das células Vero (CC<sub>50</sub>) tratadas com os diferentes extratos. A cloroquina, um antiviral de referência, foi utilizada como controle.

Tabela 1 – Avaliação da citotoxicidade dos extratos de *Maytenus* sp. em células Vero

Amostras	CC <sub>50</sub> µg/mL
M7	43,7 $\pm$ 1,6
M8	134,1 $\pm$ 2,1
M9	953,0 $\pm$ 2,7
M10	34,8 $\pm$ 1,5

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

CLOROQUINA	9,4 ± 1,0
------------	-----------

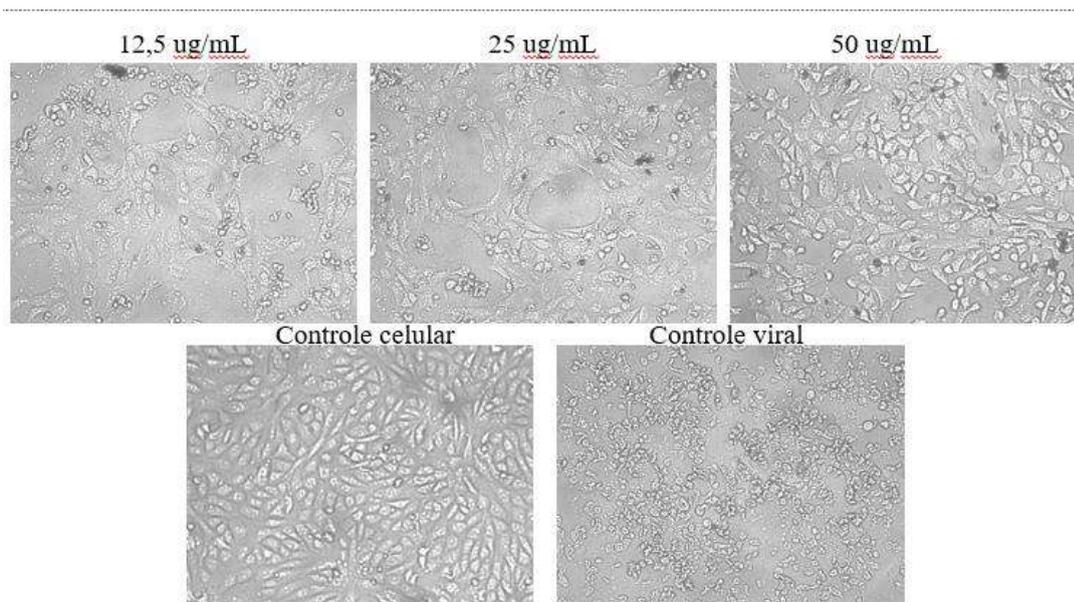
O teste mostrou que nenhuma das amostras foi tóxica às células, sendo todas direcionadas ao teste antiviral. No estudo de NABENDE, 2015 foi observado que, o extrato de hexano de folhas de *Maytenus undata* também demonstra baixa toxicidade sobre células Vero e devido a isso o extrato foi direcionado a estudos de atividade biológica, assim como os extratos do nosso trabalho.

### 3.2. A atividade antiviral

O ensaio de atividade antiviral global, em que células e vírus são tratados antes, durante e após

contra o ZIKV, com uma  $CE_{50}$  de 10,9  $\mu\text{g/mL}$ . Em um estudo similar, avaliando atividade de extratos de folhas de *Tontelea micrantha* contra o ZIKV, Ferreira et al., (2019) encontraram concentrações inibitórias entre 59 e 83  $\mu\text{g/mL}$ , o que mostra que o extrato do nosso estudo é promissor como anti-ZIKV e para o direcionamento para estudos de mecanismo de ação, considerando que, além do baixo valor da  $CE_{50}$ , o extrato M9 também apresentou um IS de 87,5 o maior observado entre os extratos avaliados, como descrito na Tabela 3. A literatura recomenda que apenas compostos com  $IS > 10$  devem ser considerados seguros e não tóxicos devido à distância entre o valor da dose farmacológica e o valor da dose tóxica.

Figura 1: Análise da redução do efeito citopático viral em células Vero



a infecção, permitiu calcular a concentração efetiva protetiva para 50% das células infectadas ( $CE_{50}$ ), e os resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Concentração protetora dos extratos de *Maytenus sp.*

Amostras	$CE_{50}$ $\mu\text{g/mL}$
M7	ND
M8	62,6 ± 1,8
M9	10,9 ± 1,0
M10	331,8 ± 2,5
CLOROQUINA	11,7 ± 1,1

Como se pode notar, o extrato M9 de folhas apresentou uma excelente atividade antiviral

Antes do ensaio antiviral ser revelado pelo MTT, uma análise microscópica foi realizada. A Figura 1 compara as condições em que houve infecção e tratamento, com o controle celular (sem infecção e sem tratamento) e o controle viral (com infecção e sem tratamento), mostrando coerência com os resultados obtidos após revelação pela técnica colorimétrica.

Tabela 3 – Índice de seletividade (IS) encontrado para os extratos de *Maytenus sp.*

Amostras	IS
M7	ND
M8	2,6
M9	87,5

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

M10	0,1
CLOR	0,8

O cálculo do IS é obtido como  $CC_{50}/CE_{50} * 100$

Como se observa, já na concentração de 25 µg/mL, as células tratadas com o extrato M9 já quase não apresentam efeitos citopáticos, mostrando a eficiência do extrato em inibir a ação viral, apresentando uma monocamada celular íntegra, apesar da infecção, comparável ao controle celular e células não infectadas.

#### 4. Conclusões

Os dados permitem concluir que o extrato de folhas de *Maytenus* sp. apresenta um efeito antiviral contra o ZIKV de forma seletiva. Esses resultados conduzem a estudos sobre o princípio ativo antiviral presente nos extratos e seus mecanismos de ação.

#### 5. Referências bibliográficas

CALISHER, C. H., AND HIGGS, S. The discovery of arthropod-specific viruses in hematophagous arthropods: an open door to understanding the mechanisms of arbovirus and arthropod evolution? *Annu. Rev. Entomol.* V. 63, p. 87–103, 2018. doi: 10.1146/annurev-ento-020117-043033

CAO-LORMEAU, V. M., BLAKE, A., MONS, S., LASTÈRE, S., ROCHE, et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study **www.thelancet.com** v. 387, 2016.

CUGOLA, F. R.; FERNANDES, I. R.; RUSSO, et. al., The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, v. 534, n. 7606, p. 267-271, 2016.

DEEPA, M. A., BAI, V. N. Bioinsecticidal Compounds of Celastraceae-the Spindle Tree Family. *International Journal of Botany.* v. 6, n. 3, p. 220-227, 2010.

DULBECCO, R. Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus. *Proc Natl Acad.* v.38, p.747-752, 1952.

EISEMBRAND, G.; POOL-ZOBEL, P.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B.J.; BOOBIS, A.; et al. Method of in vitro toxicology. *Food Chem Toxicol.* v.40, n.1, p.193-236, 2002.

EISEMBRAND, G.; POOL-ZOBEL, P.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B.J.; BOOBIS, A.; et al. Method of in vitro toxicology. *Food Chem Toxicol.* v.40, n.1, p.193-236, 2002.

FERRAZ, A. C.; MORAES, T. F. S.; NIZER, W. S. C.; SANTOS, M.; TÓTOLA, A. H.; FERREIRA, J. M. S.; VIEIRA-FILHO, S. A.; RODRIGUES, V. G.; DUARTE, L. P.; MAGALHÃES, C. L. B.; MAGALHÃES, J. C. Virucidal activity of proanthocyanidin against Mayaro

vírus Antiviral Research v. 168, p. 76-81, 2019.

FERREIRA, F. L.; HAUCK, M. S.; DUARTE, L. P.; MAGALHÃES, J. C.; DA SILVA, L. S. M.; PIMENTA, L. P. S.; LOPES, J. C. D.; MERCADANTE- SIMÕES, M. O.; VIEIRA FILHO, S. A. Zika Virus Activity of the Leaf and Branch Extracts of *Tontelea micrantha* and Its Hexane Extracts Phytochemical Study. *J. Braz. Chem. Soc.* v. 30, n. 4, 2019.

JOLY, C. A.; HADDAD, C. F. B.; VERDADE, L. M.; OLIVEIRA, M. C.; BOLZANI, V. S.; BERLINCK, R. G. S. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. **Revista USP**, n. 89, p. 114-133, 2011

MENEZES, S. A., COSTA, Y. A., COSTA, H. P., GILDO, M. G. P., SAMPAIO, M. G. V. ARBOVIROSES: O IMPACTO DA FEBRE ZIKA NA SOCIEDADE *Revista Expressão Católica (Saúde)* v. 1, n. 1, 2016.

METZ, SL W., PIJLMAN, G. P. Arbovirus vaccines; opportunities for the baculovirus-insect cell expression system. **Journal of Invertebrate Pathology** v. 107, p. S16–S30, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, ZIKA VIRUS Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/zika-virus>. Acesso em: 09/08/2019.

MMA - MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE: BIODIVERSIDADE BRASILEIRA. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira> Acesso em: 09 agosto 2019.

NAMUKHOSI, P. Nabende Safety and anti-proliferative activity of *Prunus africana*, *Warburgia stuhlmannii* and *Maytenus senegalensis* extracts in breast and colon cancer cell lines (TESE) Mestrado de Ciência em Medicina Molecular na Universidade Jomo Kenyatta de Agricultura e Tecnologia, 2015.

RODRÍGUEZ-MORALES, A. J. Zika: the new arbovirus threat for Latin America. **J Infect Dev Ctries** v. 9, n. 6, p. 684-685, 2015

SPINDOLA, K.C.W., et al. Anti-Mayaro virus activity of *Cassia australis* extracts (Fabaceae, Leguminosae). *Parasites & Vectors*, v. 7, 2014.

VASILAKIS, N., TESH, R.B. Insect-specific viruses and their potential impact on arbovirus transmission. *Curr. Opin. Virol.*, v. 15, p. 69-74, 2015.

WEAVER, S.C., REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res.* v. 85, n. 2, p. 328-45, 2010.

YASUHARA-BELL, J., LU, Y. Marine compounds and their antiviral activities. *Antiviral Res.* v. 86, p. 231-240, 2010.

YUKI, N., HARTUNG, H. P. Guillain-Barré syndrome. **N Engl J Med** v. 366, p. 2294–304, 2012.

ZANLUCA, C., DE MELO, VC, MOSIMANN, AL, DOS SANTOS, GL., DOS SANTOS, CN., LUZ, K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 110, p. 569-572, 2015.

#### 6. Apoio financeiro

Agradecemos o apoio dos órgãos de financiamento CAPES, FAPEMIG, UFSJ e CNPQ.

## A APLICAÇÃO TÓPICA DE COLÁGENO HOMÓLOGO ACELERA O PROCESSO DE RE-EPITELIZAÇÃO EM LESÕES

Oliveira<sup>1</sup>, R. M. S.; Castro, R. A<sup>1</sup>.; Barreto, R. A<sup>1</sup>.; Peixoto, I, O<sup>1</sup>.; Silva, R. S. R<sup>1</sup>.; Alvarenga, E. L. F. C<sup>1</sup>.; Costa, R. A<sup>1</sup>.; Carvalho, C. R<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal de São João del-Rei, Departamento de Ciências Naturais

<sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Morfologia- Instituto de Ciências Biológicas.

E-mail: mileibraisa@gmail.com

### 1. Introdução

A pele é o tecido mais externo do nosso corpo e está sujeita a traumas mecânicos que geralmente se fecham deixando cicatrizes normotróficas. Por outro lado, em condições ainda pouco caracterizadas mas muitas vezes relacionadas a aumento da inflamação local, pode haver deposição excessiva de matriz extracelular, levando a formação de cicatrizes hipertróficas ou até queloides (MOGILI *et al.*, 2012; MARTIN; NUNAN, 2015; CHEN *et al.*, 2016). Uma das estratégias para melhorar o processo de reparo de lesões é alterar a fase inflamatória

A restauração da integridade da pele requer um evento dinâmico e complexo que envolve um conjunto de células residentes no tecido e outras recrutadas para o local da injúria, até a formação/maturação do tecido de reconstituição (LAROUCHE *et al.*, 2018).

A tolerância imunológica é um fenômeno adquirido durante a ontogênese, dependente de complexas interações entre linfócitos, que se forem alteradas podem resultar em diferentes patologias, denominadas autoimunes. A ingestão de proteínas também ativa linfócitos e resulta em tolerância, neste caso denominada tolerância oral. Já se sabe que a injeção de proteínas toleradas em adjuvantes, tem efeitos anti-inflamatórios sistêmicos e, se injetadas

concomitantemente com uma lesão na pele, melhoram o reparo (CARVALHO *et al.*, 2002; AZEVEDO *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2016; CANTARUTI *et al.*, 2017).

Outra forma para melhorar o reparo de feridas tem sido a aplicação de *Scaffolds* associados ou não a fatores de crescimento, células e/ou mediadores anti-inflamatórios. *Scaffolds* são estruturas tridimensionais porosas que podem imitar a matriz extracelular e assim facilitar interações entre as células, a migração e proliferação celular, de modo que elas possam reconstituir o tecido original. Há na literatura estudos que mostram que os *scaffolds* proporcionam diversos benefícios em feridas como proteção contra infecções, proteção contra perda de água, redução da dor e facilitação do fechamento da ferida (HOGREBE; GOOCH, 2016; CHAN *et al.*, 2016). Frequentemente tem sido utilizado nos *scaffolds* materiais naturais, polímeros sintéticos, biodegradáveis ou polímeros com proteínas que auxiliam na formação de novos tecidos (HOGREBE; GOOCH, 2016).

Um dos materiais muito utilizados nos *scaffolds* tanto em forma de malha, como em gel ou esponja é o colágeno (HOGREBE; GOOCH, 2016). O colágeno vem sendo estudado na engenharia de tecidos da pele e tem como resultado a aceleração da cicatrização de feridas

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

(HARRISON; MACNEIL, 2008) além de promover uma aceleração da angiogênese (CHAN et al., 2016). O colágeno utilizado nos *Scaffolds* pode ser colhido de diversas fontes, como por exemplo, de pele bovina, porcina e equina. Um dos mais utilizados é o colágeno do tipo I bovino (CHAN et al., 2016).

Uma vez que a tolerância imunológica ao colágeno usado nos *Scaffolds* pode interferir no reparo das lesões, comparamos os efeitos da aplicação de colágeno bovino (heterólogo) com colágeno murino (homólogo) na cicatrização de feridas cutâneas.

## 2. Metodologia

Foi utilizado o modelo de lesão excisional na pele de camundongos da linhagem *Swiss*, machos com 8 semanas de idade (n=5). O colágeno homólogo foi obtido a partir da cauda de camundongos *Mus musculus* da linhagem *Swiss*, e o colágeno heterólogo (bovino) foi obtido a partir do tendão bovino.

Para verificar a estrutura da malha e topografia do colágeno foi realizada uma análise de Microscopia de Força atômica- Nanoscope IV MultiMode SPM (Bruker Instruments). A partir dos colágenos bovino e murino foi feito um gel para aplicação na área da lesão. O gel aplicado permaneceu na lesão por 5 dias.

No dia 7 após a lesão os animais foram eutanasiados e a pele foi coletada, fixada em formalina de Carlson e corada em Hematoxilina & Eosina para análise histopatológica ou em Alcian-Blue para contagem de mastócitos. Projeto aprovado pelo CEUA-UFSJ-protocolo 049/2017.

## 3. Resultados e Discussão

No grupo que recebeu um curativo de colágeno homólogo, a re-epitelização estava completa na maioria dos animais e houve uma diminuição no tamanho do tecido de granulação, enquanto no grupo controle salina e no que recebeu colágeno heterólogo ainda não havia re-

epitelização completa (Figura 1). Nos animais do grupo que recebeu colágeno homólogo também havia uma deposição de matriz extracelular mais acelerada e menor densidade de leucócitos em comparação com os animais do grupo controle salina (Figura 2). Estudos têm demonstrado que a infiltração excessiva de leucócitos no leito da ferida pode piorar o processo de cicatrização, retardando a re-epitelização e levando a deposição de matriz extracelular mais desorganizada (KIM et al., 2019). Sugerimos que devido à baixa concentração de leucócitos no grupo homólogo houve um menor tecido de granulação, acelerando seu processo de re-epitelização e consequentemente aceleração no processo de deposição de matriz extracelular. Outros estudos com modelos experimentais demonstram que a redução do infiltrado inflamatório leva a um menor dano tecidual, consequentemente a uma cicatriz reduzida ou à regeneração do órgão como demonstrado em feridas incisionais na pele de camundongos *nude* (GAWRONSKA-KOZAK et al., 2006). O curativo com colágeno heterólogo produziu um efeito de *scaffold*, pois, sua re-epitelização foi igual ao grupo controle salina e mais atrasada em relação ao grupo que recebeu colágeno autólogo embora com menor infiltrado inflamatório que o grupo controle salina.

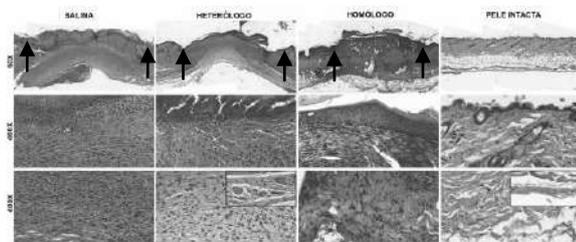
Os curativos com colágenos não alteraram significativamente o número de fibroblastos, a angiogênese (Figura 2), nem o número de mastócitos (Figura 3) e nem a maturação dessas células: maduro (corado de vermelho), imaturo (corado de azul) e intermediário (corado de roxo). Nos grupos tratados com colágeno tanto autólogo quanto heterólogo houve maior presença de mastócitos maduros do que mastócitos imaturos e intermediários, porém não foi observada diferença significativa entre os grupos (Figura 3). A presença de mastócito no leito da ferida foi quase nulo, estando em maior número na derme adjacente à borda da região de reparo da lesão. Mastócitos são

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

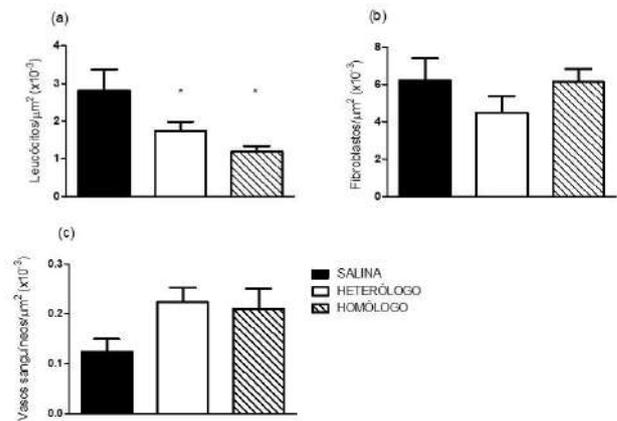
células residente importantes para a reepitelização da ferida que tanto na sua ausência ou com alta proliferação atrasa o processo de reepitelização, além disso afeta no número de fibroblasto, o que no nosso estudo não teve interferência dessas células.

Os *scaffolds* de colágeno bovino têm sido utilizados para induzir a vascularização em implantes, associados a outros componentes da matriz extracelular (CHAN *et al.*, 2016; BABRNÁKOVÁ *et al.*, 2019; KANG *et al.*, 2019). Como o colágeno heterólogo que usamos possuía uma malha de fibras mais fechada, com fibras mais espessas e mais largas do que o colágeno autólogo, pode ser que isso tenha interferido na migração celular e na vascularização.

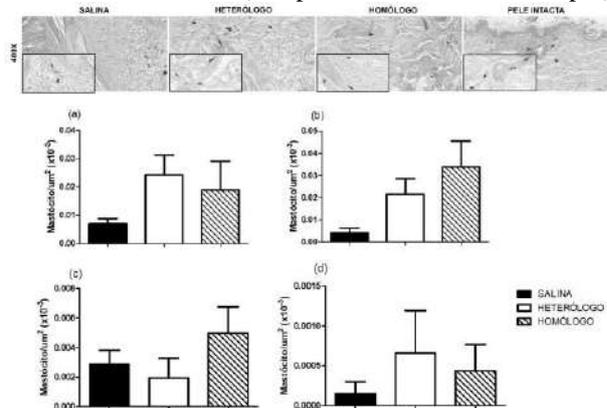
Sugerimos que o uso do colágeno homólogo produziu um efeito indireto da tolerância imunológica que acelerou o processo de reepitelização. Porém o uso com colágeno heterólogo produziu um efeito de *scaffold*, onde a re-epitelização foi mais atrasada mesmo com uma baixa inflamação.



**Figura 1:** Aplicação de curativos com colágeno homólogo acelera o processo de repitelização quando comparado com o colágeno heterólogo ou controle Salina. Imagens representativas da área de reparo aos 7 dias após lesão excisional na pele do dorso de camundongos Swiss. Coloração Hematoxilina e Eosina, aumento de 50X, escala da barra=200  $\mu\text{m}$ , aumento de 400X escala da barra=50  $\mu\text{m}$ . Setas indicando área da lesão. Insert mostrando feixes nervosos.



**Figura 2:** Aplicação de curativos com colágeno homólogo e heterólogo promove uma diminuição no número de células inflamatórias, 7 dias após lesão excisional na pele do dorso de camundongos Swiss. Em (a) a densidade de fibroblastos, em (b) a densidade de leucócitos, em (c) a densidade de vasos sanguíneos. Coluna preta grupo controle Salina, coluna branca grupo Heterólogo, coluna hachurada grupo Autólogo. Teste estatístico Anova (one-way não paramétrico-  $p < 0,05$ ), pós teste Newman- Keuls (compara todas as colunas em par).



**Figura 3:** Análise de mastócitos aos sete dias após a lesão e aplicação tópica de colágeno homólogo ou heterólogo. Imagens representativas da região de reparo aos 7 dias após a lesão. Nota-se maior presença de mastócitos na derme adjacente à área da lesão, porém não teve diferença significativa na quantidade de mastócitos (a-d). Coloração alcian blue e safranina, aumento de 400X escala da barra=50  $\mu\text{m}$ . Teste estatístico Anova (one-way não paramétrico -  $p < 0,05$ ), pós teste Newman-Keuls (compara todas as colunas em par).

## 4. Conclusão

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

O uso do colágeno heterólogo pode ter produzido um efeito do *scaffold* além do imunológico, enquanto o uso do colágeno homólogo pode ter um maior efeito imunológico da tolerância. Mais estudos devem ser feitos visando aplicação de colágeno homólogo para a aceleração do processo de reepitelização o que é muito importante para reconstituição da barreira epitelial.

### 5. Referências Bibliográficas

- AZEVEDO, G. M.; COSTA, R. A.; RESENDE, M. A.; *et al.* Indirect effects of oral tolerance inhibit pulmonary granulomas to *Schistosoma mansoni* eggs. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012.
- BABRNÁKOVÁ, J.; PAVLIŇÁKOVÁ, V.; BRTNÍKOVÁ, J.; *et al.* Synergistic effect of bovine platelet lysate and various polysaccharides on the biological properties of collagen-based scaffolds for tissue engineering: Scaffold preparation, chemo-physical characterization, in vitro and ex ovo evaluation. **Materials Science and Engineering C**, v. 100, n. August 2018, p. 236–246, 2019.
- CARVALHO, C. R.; LENZI, H. L.; CORREA-OLIVEIRA, R.; VAZ, N. M. Indirect effects of oral tolerance to ovalbumin interfere with the immune responses triggered by *Schistosoma mansoni* eggs. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 10, p. 1195–1199, 2002.
- CHAN, E. C.; KUO, S. M.; KONG, A. M.; *et al.* Three dimensional collagen scaffold promotes intrinsic vascularisation for tissue engineering applications. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–15, 2016.
- CHEN, D.; HAO, H.; FU, X.; HAN, W. Insight into reepithelialization: How do mesenchymal stem cells perform? **Stem Cells International**, v. 2016, 2016.
- GAWRONSKA-KOZAK, B.; BOGACKI, M.; RIM, J. S.; MONROE, W. T.; MANUEL, J. A. Scarless skin repair in immunodeficient mice. **Wound Repair and Regeneration**, v. 14, n. 3, p. 265–276, 2006.
- HARRISON, C. A.; MACNEIL, S. The mechanism of skin graft contraction: An update on current research and potential future therapies. **Burns**, v. 34, n. 2, p. 153–163, 2008.
- HOGREBE, N. J.; GOOCH, K. J. Direct influence of culture dimensionality on human mesenchymal stem cell differentiation at various matrix stiffnesses using a fibrous self-assembling peptide hydrogel. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 104, n. 9, p. 2356–2368, 2016.
- KANG, P. L.; HUANG, H. H.; CHEN, T.; JU, K. C.; KUO, S. M. Angiogenesis-promoting effect of LIPUS on hADSCs and HUVECs cultured on collagen/hyaluronan scaffolds. **Materials Science and Engineering C**, v. 102, n. March, p. 22–33, 2019.
- KIM, M.; CHOE, Y. E.; KIM, G. H. Injectable hierarchical micro/nanofibrous collagen-based scaffolds. **Chemical Engineering Journal**, v. 365, n. October 2018, p. 220–230, 2019.
- MARTIN, P.; NUNAN, R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. **British Journal of Dermatology**, v. 173, n. 2, p. 370–378, 2015.
- MOGILI, N. S.; KRISHNASWAMY, V. R.; JAYARAMAN, M.; *et al.* Altered angiogenic balance in keloids: A key to therapeutic intervention. **Translational Research**, v. 159, n. 3, p. 182–189, 2012. Mosby, Inc .
- ROUSSELLE, P.; BRAYE, F.; DAYAN, G. Re-epithelialization of adult skin wounds: Cellular mechanisms and therapeutic strategies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2018. Elsevier B.V.

### ESTUDO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO AMIDO OBTIDO DA FRUTA-DE-LOBO (*Solanum lycocarpum*).

**Carmo<sup>1</sup>, M. R. A.; Ribeiro<sup>1</sup>, T. R.; Nunes<sup>2</sup>, T. H. H.; Oliveira<sup>3</sup>, A. M. e Oliveira Júnior<sup>3</sup>, E. N.**

<sup>1</sup> Universidade Federal de São João Del Rei - UFSJ / CAP, Programa de pós-graduação em tecnologias para o desenvolvimento sustentável- Mestrado em Ciências com ênfase em desenvolvimento de tecnologias sustentáveis.

<sup>2</sup> Universidade Federal de São João Del Rei - UFSJ / CAP, Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos – Engenharia de Bioprocessos.

<sup>3</sup> Universidade Federal de São João Del Rei São João del Rei, Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos – Engenharia de Bioprocessos.

E-mail: carmo.mariana@ymail.com e eniobio@ufsj.edu.br

#### *1-Introdução*

O grande crescimento econômico e as questões referentes à importância do desenvolvimento sustentável nos dias atuais têm estimulado um aumento da procura de energias mais limpas, em substituição ao combustível fóssil. Além de ser um recurso finito, os combustíveis fósseis, principalmente o petróleo, contribuem significativamente com o agravamento do efeito estufa, por meio da emissão de gases poluentes (ADITYA et al, 2016).

Uma alternativa que visa a diminuição da dependência de recursos não renováveis são os combustíveis produzidos a partir de biomassa, como os biocombustíveis (ADITYA et al, 2016).

O bioetanol (biocombustível) pode ser produzido a partir de diversas fontes de biomassa, desde que apresentem quantidades significativas de carboidratos, como a celulose e o amido (ADITYA et al, 2016).

A *Solanum Lycocarpum*, pertencente à família da solanácea é popularmente conhecida como fruta-de-lobo. Esse fruto apresenta uma grande quantidade de amido, portanto, é uma matéria-prima promissora para a produção de etanol (OLIVEIRA-FILHO e OLIVEIRA, 1988).

Como o amido não pode ser fermentado diretamente, é necessário uma hidrólise prévia da sua cadeia para obter a glicose. A reação de hidrólise ocorre na presença de catalisadores ácidos ou

enzimáticos visando a separação da cadeia longa do amido liberando cadeias mais curtas de dextrina, maltose e glicose. A hidrólise enzimática apresenta várias vantagens quando comparada à hidrólise ácida, sendo a mais importante a alta especificidade da reação com o substrato (CYPRYCH et al., 2014).

A concentração de enzima pode influenciar diretamente no rendimento da produção de hidrólise do amido. Portanto, é necessário encontrar a concentração ideal de enzimas para atingir uma hidrólise eficiente (CYPRYCH et al., 2014). Este trabalho objetivou avaliar o efeito das concentrações de  $\alpha$ -amilase (LIQUOZYME SC DS) e amiloglicosidase (SPIRIZYME FUEL HS) sobre o rendimento e perfil de açúcar no processo de hidrólise-sacarificação do amido, visando obter maiores rendimentos em açúcares fermentáveis.

## 2 – *Material e Métodos*

### 2.1 *Obtenção do amido*

Os frutos foram lavados com água destilada, descascados, tendo suas polpas picadas e moídas em um multiprocessador doméstico wallita 750W. Uma solução de metabissulfito de sódio ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ) foi previamente preparada e utilizada em uma proporção de 0,5 kg de matéria-prima  $\text{L}^{-1}$  de solução para evitar o escurecimento da polpa da fruta. A polpa foi processada em liquidificador doméstico com água destilada na proporção de 1: 1 (polpa / água) e, posteriormente, filtrada e armazenada para decantação. O amido contido na polpa foi obtido por três decantações sucessivas.

Cada decantação durou 12 horas e, posteriormente, o amido foi seco em estufa a  $30^\circ \text{C}$  por 96 horas.

### 2.2 *Hidrólise Enzimática*

A hidrólise do amido foi realizada utilizando 2 enzimas comerciais produzidas pela Novozymes A / S. A solução de água e a enzima Liquozyme SC DS (alfa-amilase) foi aquecida a  $85^\circ \text{C}$  e a suspensão de amido (16% m / v) foi gradualmente adicionada até à sua completa gelatinização. Após 2h30min de reação, a temperatura foi reduzida para  $65^\circ \text{C}$  para iniciar o processo de sacarificação. Nesta fase, a enzima Spirizyme Fuel HS (gluco-amilase) foi adicionada. A reação foi incubada à temperatura indicada com agitação rotativa a 140 rpm durante as 24 horas. Para a avaliação do efeito da concentração enzimática na produção de açúcar, foi realizado um delineamento central composto rotacional, o planejamento foi realizado com 3 repetições no ponto central, 2 variáveis de entrada estudadas (volume da enzima Liquozyme SC DS (v/m) e Spirizyme Fuel HS (v/m)) em dois níveis e 4 pontos axiais, totalizando 11 ensaios (Tabela 1). A variável resposta analisada foi a concentração de açúcares redutores ( $\text{g L}^{-1}$ ) MILLER (1959).

## 3 – *Resultados e discussões*

### 3.1 – *Amido*

O rendimento do amido obtido a partir de fruta-de-lobo no estágio de maturação semi-maduro com base na polpa fresca foi de 4,99 g de amido / 100 g de polpa fresca. Rocha et al. (2012)

encontrou em seus estudos com a fruta-de-lobo, 5,98 g de amido / 100 g de polpa fresca. A diferença nos resultados pode ser justificada em razão das diferentes condições sazonais em que os frutos estavam submetidos.

O resultado indica que a fruta-de-lobo pode ser utilizada como matéria-prima para a produção de etanol.

### 3.2 – Açúcares redutores

A concentração de glicose nos hidrolisados variou entre 112,37 g L<sup>-1</sup> e 159,05 g L<sup>-1</sup> (Tabela 1).

O ensaio que apresentou melhor rendimento de AR (açúcar redutor) foi o ensaio 8 que continha 15,07 (μL g<sup>-1</sup>) de Liquozyme SC DS combinada com 43,25 (μL g<sup>-1</sup>) de Sprizyme Fuel HS.

Por meio da tabela 1, pode-se observar que o ensaio 9 que continha 15,07 (μL g<sup>-1</sup>) de Liquozyme e 26,08 15,07 (μL g<sup>-1</sup>) de Sprizyme obteve uma quantidade semelhante de açúcares redutores (155,11 g L<sup>-1</sup>). Nesse caso tem-se uma produção de AR próxima com uma diminuição da quantidade da segunda enzima.

Menezes et al. (2016) realizando a hidrólise enzimática do amido de batata (pertencente à família da Solanacea), variando as concentrações de enzimas, encontraram o maior teor de glicose no hidrolisado de 128,3 (g L<sup>-1</sup>) para uma suspensão de 12,5% de amido. Isso mostra que o hidrolisado do amido da fruta-de-lobo pode ser uma alternativa para a produção de etanol.

Tabela 1 – Delineamento experimental da hidrólise enzimática do amido da fruta-de-lobo e concentração de AR obtida.

Ensaio	Variáveis independentes		
	Codificadas / Reais		
	(v/m)		
	Liquozyme SC DS <sup>a</sup> (μL g <sup>-1</sup> )	Spirizyme Fuel HS <sup>b</sup> (μL g <sup>-1</sup> )	AR* (g L <sup>-1</sup> )
1	-1 (7,14)	-1 (13,91)	131.29
2	1 (7,14)	-1 (38,26)	119.46
3	-1 (23,01)	1 (13,91)	133.17
4	1 (23,01)	1 (38,26)	140.60
5	-1.41 (3,89)	0 (26,08)	137.13
6	+1.41(26,26)	0 (26,08)	141.39
7	0 (15,07)	-1.41 (8,92)	112.37
8	0 (15,07)	+1.41 (43,25)	159.05
9	0 (15,07)	0 (26,08)	155.11
10	0 (15,07)	0 (26,08)	147.85
11	0 (15,07)	0 (26,08)	152.43

a- Enzyme activity declared: 302.4 KNU-S/mL (1 KNU-S: amount of enzyme that hydrolyzes 5.26 g of starch per hour).

b- Enzymatic activity declared: 1638.75 AGU/ml (1 AGU: amount of enzyme that hydrolyses one μmol of maltose per minute)

\*AR = Açúcar redutor.

A análise de variância (ANOVA) foi obtida por meio do software Statistica 7.0. O coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) obtido foi de 0,84, ou seja, 84% da variação da resposta é explicada pelo modelo e 16% se atribuiu aos resíduos. Dessa forma, a análise de variância (Tabela 2) mostrou que o modelo quadrático se ajustou bem aos dados experimentais em relação ao teor de açúcares redutores.

Tabela 2 – Valores da ANOVA para AR após a hidrólise enzimática.

Fonte	SQ	GL	QM	F	R <sup>2</sup>
Regressão	1514,00	2	757,00	10	0,84
Resíduo	602,89	8	75,36		
Total	2116,89	10			

\*F<sub>calc</sub> = 10.05; F<sub>tab</sub> = F(2;8;0,05) = 4.46.

\*SQ – Soma dos Quadrados; GL – Grau de Liberdade; QM – Quadrado Médio.

Na figura 1, pode-se observar que para obter maiores concentrações de açúcares redutores, sob as mesmas condições experimentais adotadas neste estudo, deve-se adicionar a concentração de Liquozyme SC DC no ponto central (0,019% m/m) combinada com a concentração de Sprizyme Fuel HS no ponto central (0,030% m / m) ou máximo (0,050% m / m).

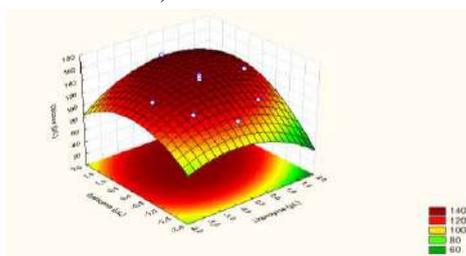


Figura 1 – Superfície de resposta do comportamento da concentração de AR (g L<sup>-1</sup>) obtido após hidrólise do amido da fruta-de-lobo em função da concentração da Liquozyme (v/m) e volume da Sprizyme Fuel HS (v/m).

#### 4 – Conclusão

A partir dos resultados observou-se que, a fim de se obter maiores concentrações de açúcares redutores, deve-se adicionar a concentração de Liquozyme SC DS no ponto central combinada com a concentração de

Spirizyme Fuel HS também no ponto central.

Os resultados obtidos neste estudo mostram que a fruta-de-lobo é uma promissora fonte de amido para diversas a produção de bioetanol a partir dos açúcares redutores liberados durante a hidrólise enzimática.

#### 5 – Referências bibliográficas

- ADITIYA, H. B.; MAHLIA, T. M. I.; CHONG, W. T.; NUR, H.; SEBAYANG, A. H. Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. v. 66. p. 631-653, 2016.
- CYPRYCH, K.; SZNITKO, L.; MYSLIWIEC, J. Starch: Application of biopolymer in random lasing. *Organic electronic*. v. 15, p. 2218-2222, 2014.
- MENEZES, A. G. T.; MENEZES E. G. T.; ALVES, J. G. L. F.; RODRIGUES L. F.; CARDOSO, M. G. Vodka production from potato (*Solanum tuberosum* L.) using three *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Jornal of the Institute of Brewing and Distilling*. v. 122, p.76-83, 2016.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426, 1959.
- OLIVEIRA FILHO, A. T.; OLIVEIRA, L. C. A. Biologia floral de uma população de *Solanum lycocarpum* St Hil. (solanaceae) 1988. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v.11, n.1/2, p.23-32.
- ROCHA, D. A.; ABREU, C. M. P.; CARDOSO, M. G.; CORRÊA, A. D.; CONTADO E. W. N. F. Obtenção e caracterização físico-química e química do polvilho da fruta-de-lobo (*Solanum lycocarpum* A. St-Hil). *Scientia Plena*, Sergipe, v. 8, n. 9, p. 1-12, 2012.
- Agradecemos ao apoio da CAPES, CNPQ e FAPEMIG.

## SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS POR COOPRECIPITAÇÃO QUÍMICA PARA REMOÇÃO DE CORANTE ÍNDIGO CARMIM EM ÁGUAS CONTAMINADAS

Silva<sup>1</sup>, T. F. L.; Teixeira<sup>1</sup>, I. B.; Bernardes-Silva<sup>2</sup>, A. C.; Quintão<sup>1</sup>, C.M.F.; Augusti,<sup>3</sup>R.;  
Urzedo<sup>2</sup>, A. P. F. M.

<sup>1</sup> Universidade Federal de São João Del-Rei, Engenharia Química

<sup>2</sup> Universidade Federal de São João Del-Rei, Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia De Bioprocessos

<sup>3</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Química

E-mail: thaisfer74@hotmail.com

### 1. Introdução

As indústrias têxteis têm contribuído largamente para a contaminação ambiental, devido a grande produção de resíduos com baixos níveis de degradação, incluindo corantes provenientes das etapas de tingimento, sendo descartados efluentes com intensa coloração [1].

Os corantes de origem sintética são bastante eficazes quanto ao tingimento e são produzidos de forma barata. Estes corantes estão sendo aprimorados para aumentar o poder de fixação contra os agentes provocadores de desbotamento e atender as exigências do mercado, porém tornam-se cada vez mais tóxicos e maléficos para o meio ambiente [2].

O corante índigo carmim (figura 1) é um corante muito utilizado na indústria alimentícia, fabricação de cápsulas como

um pigmento solúvel, empregado como corante de contraste para a mucosa colorretal para melhor visualização de lesões detectadas pela colonoscopia, e é também usado como agente complexante para a análise de cobre por espectrofotometria. Entretanto, seu principal emprego acontece nas indústrias têxteis devido a sua baixa solidez, resistência a abrasão e ao alvejamento, sendo um dos mais utilizados para o tingimento de tecidos de algodão jeans, possuindo coloração azul [3,4].

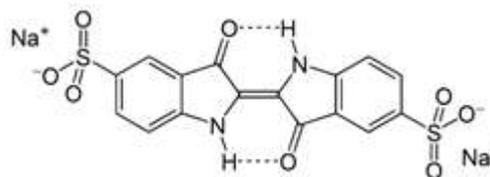


Figura 1 – Estrutura molecular do índigo carmim.



## II SIMPÓSIO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA



Universidade Federal  
de São João del-Rei

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

As substâncias corantes contribuem significativamente para a poluição de recursos hídricos por dificultarem a penetração dos raios solares, prejudicando o metabolismo fotossintético de algumas espécies; além disso, apresentam-se como recalcitrantes e potencialmente cancerígenas [5].

Devido a necessidade de desenvolvimento de processos de tratamento de efluentes que garantam uma boa eficiência na remoção de corantes, a síntese de partículas magnéticas incrustadas em biocarvão, apresentaram-se como uma boa forma de remover o corante índigo carmim dos efluentes industriais. Adsorventes magnéticos são extremamente interessantes, pois podem ser removidos da solução através de um ímã, facilitando o processo de tratamento de efluentes.

### 2. Material e Métodos

A síntese das nanopartículas magnéticas incrustadas em biocarvão foi preparada através do método modificado de Mohan D et al [6]. O método utiliza a impregnação de nanopartículas magnéticas em carvão ativado. Para tal, as nanopartículas magnéticas foram sintetizadas in-situ, pela co-precipitação do sulfato ferroso com cloreto férrico em meio alcalino e, em um meio rico em biocarvão.

Assim, para este trabalho, inicialmente, 10 g de biocarvão foram adicionados a 500 mL de água ultrapura e mantidos sob agitação. Enquanto isso, 0,067 mol de ferro trivalente ( $Fe^{3+}$ ) foram misturados a 0,033 mol de ferro bivalente ( $Fe^{2+}$ ) em 200

mL de água num béquer de 500 mL. Além disso, também foram adicionados a esta solução 2,5 mL de HCl.

Esta solução foi misturada ao biocarvão ativado aquoso preparado anteriormente e agitada vigorosamente por 15 minutos a 70°C. Após este tempo, foram adicionados à mistura, 500 mL de uma solução de hidróxido de sódio ( $NaOH$ ) 4 mol  $L^{-1}$ , deixando-se o sistema sob agitação por duas horas.

Posteriormente a este procedimento, o precipitado formado foi coletado em tubos falcon, lavado com água ultrapura e centrifugado por 10 vezes. Logo a seguir, os tubos com os precipitados foram secos em estufa a 60°C, por 24 horas. Após este procedimento, obteve-se um material magnético de coloração negra.

### 3. Resultados e Discussão

O grande interesse no estudo da nanopartícula de óxido de ferro é devido sua propriedade magnética. A propriedade magnética corresponde à força ou influência atrativa ou repulsiva que um material impõe sobre outros materiais [7].

A caracterização magnética foi realizada empregando-se um ímã de neodímio e aproximando-o das amostras sólidas e em meio aquoso com o objetivo de verificar a presença do campo magnético. O resultado é da atração das amostras sólidas é mostrado na figura 2.



Figura 2 - Partículas magnéticas atraídas pelo ímã.

Através da magnetização foi possível observar o movimento das partículas sólidas e em meio aquoso na direção ao campo magnético, sendo esta uma das propriedades dos materiais ferromagnético

Após testada sua capacidade magnética verificou-se o poder de adsorção do material. A 20 mL de uma solução de índigo carmim de concentração  $40 \text{ mg L}^{-1}$ , adicionaram-se 100 mg do material magnético, deixando-se o sistema sob agitação por quinze minutos.

Decorrido este tempo, colocou-se a solução em contato com um ímã para que o adsorvente fosse retirado. Notou-se que restaram na solução poucas partículas adsorventes. Assim, posteriormente, a mesma foi filtrada com um filtro de seringa de  $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ . Sequencialmente, fez-se a leitura da solução em espectrofotômetro UV-Vis, em  $610 \text{ nm}$ , verificando-se que houve a remoção de cerca de 66% do corante em solução.

Foi possível analisar que a absorvância do corante sem adsorvente foi maior do que a mesma do corante com adsorvente, essa variação pode ser explicada pela adsorção de corante pela nanopartícula magnética.

Na literatura, o valor encontrado para a porcentagem de adsorção do corante índigo carmim, em uma concentração de  $40 \text{ mg L}^{-1}$ , por carvão ativado produzido a partir de resíduos da produção de farinha de trigo foi de 18,61% [8]. Para o carvão ativado comercial, utilizando soluções do corante com concentrações pré definidas apresentou um desempenho de adsorção de 98% [9].

Comparativamente ao valor para o carvão ativado advindo da biomassa, as nanopartículas apresentaram uma melhor performance. Contudo, em relação ao carvão ativado comercial, o material não se mostrou tão eficaz, já que variáveis como pH e temperatura não foram analisadas.

#### 4. Conclusão

O aumento da complexidade e dificuldade para o tratamento de efluentes das indústrias têxteis tem demandado pesquisas de novas metodologias para tratamento destes rejeitos. As nanopartículas magnéticas mostraram ser bom adsorvente, removendo grande quantidade do corante têxtil índigo carmim da solução aquosa. Além disso, o processo de separação do adsorvente da solução foi facilitado, já que apenas a presença de um ímã é suficiente para ocorrer a separação, simplificando e



## II SIMPÓSIO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA



Universidade Federal  
de São João del-Rei

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

barateando o tratamento de efluentes aquosos contaminados.

### 5. Agradecimentos

Ao CNPQ/FAPEMIG (SICONV – 793988/2013).

### 6. Referências Bibliográficas

1. DELLAMATRICE, P. M. Biodegradação e Toxicidade de Efluentes Têxteis e Efluentes da Estação de Tratamento de Águas Residuárias de Americana- SP, 2003, 137f. Tese (Doutorado em Ecologia de Agrossistemas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2005.
2. PEIXOTO, F; MARINHO, G; RODRIGUES, K. Corantes Têxteis: Uma Revisão. HOLOS. v. 5. Ceará. Out. 2013.
3. LOPES, R. P.; Estudo de processos alternativos para a degradação de compostos de relevância ambiental com monitoramento dos produtos formados por Espectrometria de Massas com Fonte de Ionização Electrospray (ESI-MS). Dissertação (Mestrado em Química – Química Analítica) – Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química, Belo Horizonte, 2008. 5.
4. LOPES, É. N.; ANDRADE, F. V. de. Estudo de estabilidade do corante índigo carmim em condições de degradação forçada. Universidade Federal de Minas Gerais. 2010.
5. PETERNEL, I.; KOPRIVANAC, N.; KUŠIĆ, H. UV-based processes for reactive azo dye mineralization. *Water Research*, v. 40, n. 3, p. 525-532, 2006.
6. Mohan D et al; Development of magnetic activated carbon from almond shells for trinitrophenol removal from water. *Chemical Engineering Journal* 2011; 172: 1111–1125.
7. ROSSATO, J. Efeitos de Escala em Nanoestruturas. Centro Universitário Franciscano, 2012.
8. Vendruscolo, C. C. Utilização de resíduos da produção de farinha de trigo como material adsorvente dos corantes têxteis índigo carmim e azul de metileno. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências Ambientais) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2017.
9. OLIVEIRA, M.K.S.; LIMA, G.C.; PORTELA, R.R.; OLIVEIRA, M.S. Avaliação comparativa da remoção do corante índigo carmine utilizando como adsorventes o carvão ativo comercial e carvão produzido a partir do pó da casca de coco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, 22., 2016, Natal.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

## INDICADORES DO CONSUMO DE ENERGIA DE DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDs) NO TRATAMENTO DE ÁGUA RESIDUÁRIA EM FOTOBIOREACTORES

Oliveira<sup>1</sup>, R. G.; Santiago<sup>2</sup>, A. F.

<sup>1</sup> Universidade Federal de São João Del Rei, DQBIO

<sup>2</sup> Universidade Federal de Ouro Preto, Departamento de Engenharia Civil

E-mail: raqgoliveira@gmail.com

### 1. Introdução

Nos fotobiorreatores, o cultivo das microalgas pode ocorrer em águas residuárias, visando obter a biomassa, concomitantemente, usada para o tratamento da mesma.

Esses sistemas podem ser iluminados com luz artificial e, dentre essas fontes de energia luminosa, os diodos emissores de luz (LEDs) vêm sendo mais amplamente utilizados no cultivo de microalgas, uma vez que emitem luz dentro do espectro de cores desejado podendo melhorar a qualidade e a produtividade de microalgas, garantindo, assim, a mistura equilibrada de comprimentos de onda de luz a ser absorvidos por esses microrganismos durante o crescimento. (ZHAO et al., 2013; OOMS et al., 2016). Por outro lado, a utilização de LEDs resulta em consumo energético para o tratamento de água residuária.

Na literatura encontraram-se diferentes autores (KIM et al., 2013, 2014a) que utilizaram a alteração dos comprimentos de onda da luz de LED azul para a luz vermelha na iluminação de fotobiorreatores operados em batelada visando o tratamento de águas residuárias. Estes trabalhos apresentaram um aumento na produtividade das microalgas e maior eficiência na remoção de nutrientes em comparação com a utilização de uma única cor da luz de LED (comprimento de onda único).

Cabe ressaltar que não foram encontrados estudos em fotobiorreator operado em regime

contínuo iluminado por LED na combinação dos comprimentos de onda citados.

O objetivo deste estudo foi investigar o uso de um fotobiorreator para o tratamento de água residuária sintética, além de avaliar o desempenho energético em função da iluminação artificial de luz de LED.

### 2. Material e Métodos

A água residuária sintética utilizada foi elaborada de acordo com a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 1996) com acréscimo na quantidade de extrato de carne. A modificação foi necessária para aproximar o valor da Demanda Química de Oxigênio (DQO) ao de uma água residuária doméstica real, que se apresenta na faixa de 450 a 800 mg.L<sup>-1</sup> de acordo com Von Sperling (2005).

A amostra utilizada como inóculo para o crescimento das microalgas foi coletada em um tanque utilizado para criação de tilápias localizado no Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto e introduzida em um fotobiorreator com volume útil de 20 L contendo água residuária sintética. O inóculo foi iluminado por fitas de LED brancas com intensidade média de 144  $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . A identificação das microalgas foi realizada por taxonomia utilizando as chaves de identificação. Foi utilizado um microscópio Olympus CX 31 equipado com câmera SC30, acoplado a um computador, e a partir do programa anlaySIS getIT versão 5.1. As

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

microalgas predominantes foram identificadas como o gênero *Chlorella*, nomeada *Chlorella* sp.

Para a realização dos experimentos construiu-se um fotobiorreator aberto em recipiente de polietileno preto com uma configuração geométrica retangular.

A água residuária era bombeada para o fotobiorreator por uma bomba peristáltica da marca Milan e modelo 618. O fotobiorreator era iluminado por quatro LEDs montados com quatro refletores holofote RGB (IP65) desmontados. Esses LEDs foram fixados em placas metálicas com 36 centímetros quadrados e colocados em um suporte acima do fotobiorreator. Um cooler foi utilizado para evitar o aquecimento do LED e consequentemente o mau funcionamento. Após passagem pelo fotobiorreator, a água residuária tratada efluente era direcionada para outro recipiente de polietileno, por gravidade.

Dos quatro LEDs, em dois, utilizou-se a luz vermelha, e, nos outros dois, utilizou-se a luz azul (na proporção 1:1). Os comprimentos de onda utilizados foram definidos de acordo com as pesquisas de Kim et al. (2013) e Kim et al. (2014a). O fluxo luminoso foi medido com um Fotorradiômetro Delta, modelo OHM HD21012, equipado com um sensor para radiação fotossinteticamente ativa (PAR), que é a faixa do espectro da radiação solar entre 400 e 700 nm. O valor médio da intensidade luminosa distribuída na superfície líquida do fotobiorreator foi de  $815 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . A tensão e a corrente dos LEDs foram medidas por meio de um multímetro digital 978MD Western na entrada dos LEDs para calcular a potência total consumida dos quatro LEDs.

O sistema foi operado durante 60 dias. Do 1º ao 11º dia, deixou-se o reator operando em batelada para que as microalgas pudessem se adaptar ao novo ambiente. Com o fim da batelada, acionou-se a bomba peristáltica e passou-se a operar o fotobiorreator em regime contínuo, a partir do 11º dia. Assim, o funcionamento do fotobiorreator foi dividido em três fases. A Fase 1 é a fase de operação

em batelada, a Fase 2 é o período de ajuste de vazão e a Fase 3 é fase de estabilidade da operação em regime contínuo.

A determinação da DQO foi realizada de acordo com APHA (2012) e teve como objetivo determinar a remoção de matéria orgânica.

O consumo de energia de LED por massa de DQO removida foi calculado de acordo com Kurt et al. (2007) e Basha et al. (2012), porém, adaptou-se para reator operado em fluxo contínuo, de acordo com a Equação 1.

$$E\left(\frac{\text{kWh}}{\text{kgDQOremovida}}\right) = \left(\frac{V \cdot I \cdot \text{TDH} \cdot 24 \cdot 10^3}{\text{DQO}_r \cdot V_f}\right) \quad (1)$$

Em que: E é a energia consumida em kWh por kg de DQO removida, V é a tensão (V), I é a corrente (A), TDH é o tempo de detenção hidráulica (d), DQO é a DQO ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) removida e  $V_f$  é volume do fotobiorreator (L).

Para o cálculo do consumo de energia de LED por volume de água residuária tratada, levou-se em consideração a vazão do fotobiorreator de  $2.88 \text{ L}\cdot\text{d}^{-1}$ . Utilizou-se a Equação 2:

$$\text{Consumo de energia} \left(\frac{\text{w}}{\text{m}^3}\right) = \left(\frac{V \cdot I \cdot 24 \text{h}}{Q \cdot 10^{-3}}\right) \quad (2)$$

Em que: V é a tensão (V), I é a corrente (A), Q é a vazão ( $\text{L}\cdot\text{d}^{-1}$ ).

### 3. Resultados e Discussão

Os valores de DQO para a água residuária sintética bruta, afluenta ao fotobiorreator, encontraram-se na faixa de  $750\text{-}850 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . O valor médio do percentual de remoção de matéria orgânica para o fotobiorreator, durante a Fase 3, e seu respectivo desvio padrão foi de  $91,1 \pm 1,3\%$  (CV de 1,4%). No fotobiorreator, as microalgas produzem oxigênio durante a fotossíntese que por sua vez é utilizado pelas bactérias heterotróficas para a degradação aeróbia da matéria orgânica. Portanto, a concentração de oxigênio foi suficiente para ser utilizada pelas bactérias, sendo que havia sempre uma concentração remanescente de OD no fotobiorreator. Assim, o sistema apresentou eficiência e estabilidade

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

operacional durante toda a Fase 3 para a remoção de DQO. Ainda, os valores aqui medidos foram maiores que os apresentados na literatura para as LATs iluminadas pelo sol como Kim et al. (2014b) e Godos et al. (2009).

Os valores medidos para os indicadores de desempenho com relação ao consumo de energia de LED para o tratamento da água residuária durante foram  $368,8 \pm 9,6$  kWh/kg DQO removida e  $287$  kWh.m<sup>-3</sup>. O consumo médio de energia por quilograma (kg) de DQO removido apresentou um elevado valor, bem como o consumo de energia de LED por volume de água residuária tratada. Isso pode ser observado quando são comparados, por exemplo, os valores obtidos na presente pesquisa com o consumo energético para aeração em lodos ativados e lagoas, o que representa o maior consumo energético em uma estação de tratamento aeróbio.

Apesar de a literatura (Yan et al., 2013a; Yan et al., 2013b) apresentar bons resultados no cultivo de microalgas visando o tratamento de água residuária em fotobiorreatores iluminados por LEDs, estas pesquisas não inferiram sobre o consumo energético da iluminação artificial. Além disso, a maior parte das pesquisas utilizou fotobiorreatores operados em regime batelada e, diante destas informações, é clara a necessidade de novas pesquisas para verificar a eficiência energética e do tratamento de águas residuárias em fotobiorreatores operados em regime contínuo e iluminados por LEDs.

#### 4. Considerações Finais

Considera-se que a intensidade luminosa utilizada ( $815 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) foi elevada, uma vez que os valores dos indicadores de consumo de energia de LED medidos durante os experimentos foram bastante elevados. Devido a este fato, mais pesquisas precisam ser realizadas em reatores operados em regime contínuo e iluminados por LEDs em diferentes intensidades, visando assegurar boa tratabilidade da água residuária e menor consumo para iluminação.

#### 5. Referências Bibliográficas

APHA. Standard Methods for examination of water and wastewater. 22a ed, Washington: American Water Work Association, Water Environmental Federation, 2012. 1496 pp.

BASHA, C. A.; SENDHIL, J.; SELVAKUMAR, K. V.; MUNISWARAN, P. K. A.; LEE, C. W. Electrochemical degradation of textile dyeing industry effluent in batch and flow reactor systems. **Desalination**, v. 285, p. 188–197, 2012.

GODOS, I.; BLANCO, S.; ENCINA, P. A. G.; BECARES, E.; MUÑOZ, R. Long-term operation of high rate algal ponds for the bioremediation of piggyery wastewaters at high loading rates. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 19, p. 4332–4339, 2009.

KIM, B. H.; KANG, Z.; RAMANAN, R.; CHOI, J. E.; CHO, D. H.; OH, H. M.; KIM, H. S. Nutrient removal and biofuel production in high rate algal pond using real municipal wastewater. **Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 24, n. 8, p. 1123–1132, 2014b.

KIM, D. G.; LEE, C.; PARK, S. M.; CHOI, Y. E. Manipulation of light wavelength at appropriate growth stage to enhance biomass productivity and fatty acid methyl ester yield using *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 159, p. 240–248, 2014a.

KIM, T. H.; LEE, Y.; HAN, S. H.; HWANG, S. J. The effects of wavelength and wavelength mixing ratios on microalgae growth and nitrogen, phosphorus removal using *Scenedesmus* sp. for wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 75–80, 2013.

KURT, U.; APAYDIN, O.; GONULLU, M. T. Reduction of COD in wastewater from an organized tannery industrial region by Electro-Fenton process. **Journal of Hazardous Materials**, v. 143, p. 33–40, 2007.

OECD: Guidelines for testing of chemicals simulation teste-aerobic sewage treatment. Technical Report. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, 1996.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

---

OOMS, M. D.; DINH, C. T.; SARGENT, E. H. SINTON, D. Photon management for augmented photosynthesis. **Nature Publishing Group**, v. 7, p. 1–13, 2016.

YAN, C.; ZHAO, Y.; ZHENG, Z.; LUO, X. Effects of various LED light wavelengths and light intensity supply strategies on synthetic high-strength wastewater purification by *Chlorella vulgaris*. **Biodegradation**, v. 24, n. 5, p. 721–732, 2013a.

YAN, C.; ZHANG, L.; LUO, Z.; ZHENG, Z. Effects of various LED light wavelengths and intensities on the performance of purifying synthetic domestic sewage by microalgae at different influent C/N ratios. **Ecological Engineering**, v. 51, p. 24–32, 2013b.

ZHAO, Y.; WANG, J.; ZHANG, H.; YAN, C.; ZHANG, Y. Effects of various LED light wavelengths and intensities on microalgae-based simultaneous biogas upgrading and digestate nutrient reduction process. **Bioresource Technology**, v. 136, p. 461–468, 2013.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

## TRATAMENTO DE ÁGUA RESIDUÁRIA EM FOTOBIORRETOR OPERADO EM REGIME CONTÍNUO E ILUMINADO POR DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDs)

Oliveira<sup>1</sup>, R. G.; Santiago<sup>2</sup>, A. F.

<sup>1</sup> Universidade Federal de São João Del Rei, DQBIO

<sup>2</sup> Universidade Federal de Ouro Preto, Departamento de Engenharia Civil

E-mail: raqgoliveira@gmail.com

### 1. Introdução

Os dois principais sistemas de cultivo de microalgas tendo como objetivo o tratamento de águas residuárias são os fotobiorreatores abertos, como as lagoas de alta taxa (LATs) e os fotobiorreatores fechados (RAWAT et al., 2011). Nos fotobiorreatores, o tratamento de água residuária em termos de remoção de matéria orgânica ocorre através da interação entre as microalgas e bactérias ou por meio de microalgas mixotróficas. No primeiro caso, as microalgas fornecem oxigênio para as bactérias aeróbias heterotróficas que, por sua vez, biodegradam os poluentes orgânicos e liberam o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) a ser usado pelas microalgas na presença de luz. No segundo caso, as microalgas mixotróficas assimilam tanto CO<sub>2</sub> quanto moléculas orgânicas como fonte de C e utilizam a luz ou a matéria orgânica como fonte de energia, permitindo que sobrevivam sob condição fototrófica e heterotrófica, simultaneamente (LIU et al., 2017).

A fonte de iluminação dos fotobiorreatores utilizados para o cultivo de microalgas pode ser luz solar ou luz artificial. Dentre as fontes de luz artificiais, os diodos emissores de luz (LEDs) vêm sendo mais amplamente utilizados no cultivo de microalgas, uma vez que emitem luz dentro do espectro de cores desejado podendo melhorar a qualidade e a produtividade de microalgas, garantindo, assim, a mistura equilibrada de comprimentos de onda de luz a ser absorvidos por esses

microrganismos durante o crescimento. Dentre outras vantagens dos LEDs, eles são livres de mercúrio e apresentam alta eficiência luminosa (ZHAO et al., 2013; OOMS et al., 2016).

Na literatura encontraram-se diferentes autores (KIM et al., 2013, 2014a) que utilizaram a alteração dos comprimentos de onda da luz de LED azul para a luz vermelha na iluminação de fotobiorreatores operados em batelada visando o tratamento de águas residuárias. Estes trabalhos apresentaram um aumento na produtividade das microalgas e maior eficiência na remoção de nutrientes em comparação com a utilização de uma única cor da luz de LED (comprimento de onda único). Cabe ressaltar que não foram encontrados estudos em fotobiorreator operado em regime contínuo iluminado por LED na combinação dos comprimentos de onda citados.

Diante do exposto, nesse trabalho foi definido que seriam utilizados LEDs como fonte de luz artificial para o cultivo de microalga em fotobiorreator operado em regime contínuo e objetivando o tratamento de água residuária sintética. Avaliou-se, portanto, a utilização de dois comprimentos de onda de luz representados pelas cores azul e vermelha.

### 2. Material e Métodos

A água residuária sintética utilizada foi elaborada de acordo com a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 1996) com acréscimo na quantidade de extrato de carne. A modificação foi

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

necessária para aproximar o valor da Demanda Química de Oxigênio (DQO) ao de uma água residuária doméstica real, que se apresenta na faixa de 450 a 800 mg.L<sup>-1</sup> de acordo com Von Sperling (2005).

A amostra utilizada como inóculo para o crescimento das microalgas foi coletada em um tanque utilizado para criação de tilápias localizado no Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto e introduzida em um fotobiorreator com volume útil de 20 L contendo água residuária sintética. O inóculo foi iluminado por fitas de LED brancas com intensidade média de 144 μE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

Para a realização dos experimentos construiu-se um fotobiorreator aberto simulando o funcionamento de uma LAT, em recipiente de polietileno preto com uma configuração geométrica retangular. No centro do recipiente, foram colocadas chapas de policarbonato. Em substituição aos pedais de uma LAT, foram utilizadas duas bombas de aquário submersas (Sarlo Better 650).

A água residuária era bombeada para o fotobiorreator por uma bomba peristáltica da marca Milan e modelo 618. O fotobiorreator era iluminado por quatro LEDs montados com quatro refletores holofote RGB (IP65) desmontados. Esses LEDs foram fixados em placas metálicas com 36 centímetros quadrados e colocados em um suporte acima do fotobiorreator. Um cooler foi utilizado para evitar o aquecimento do LED e consequentemente o mau funcionamento. Após passagem pelo fotobiorreator, a água residuária tratada efluente era direcionada para outro recipiente de polietileno, por gravidade.

Dos quatro LEDs, em dois, utilizou-se a luz vermelha, e, nos outros dois, utilizou-se a luz azul (na proporção 1:1). Os comprimentos de onda utilizados foram definidos de acordo com as pesquisas de Kim et al. (2013) e Kim et al. (2014a). O fluxo luminoso foi medido com um Fotorradiômetro Delta, modelo OHM HD21012, equipado com um sensor para radiação fotossinteticamente ativa (PAR), que

é a faixa do espectro da radiação solar entre 400 e 700 nm. O valor médio da intensidade luminosa distribuída na superfície líquida do fotobiorreator foi de 815 μE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

O sistema foi operado durante 60 dias. Do 1º ao 11º dia, deixou-se o reator operando em batelada para que as microalgas pudessem se adaptar ao novo ambiente. Com o fim da batelada, acionou-se a bomba peristáltica e passou-se a operar o fotobiorreator em regime contínuo, a partir do 11º dia. A Tabela 1 a seguir apresenta as variáveis analisadas durante o regime contínuo e sua respectiva referência.

Tabela I. Variáveis avaliadas, princípio do método e respectivas referências.

Variável	Princípio do método	Unidade	Referência
Temperatura, OD, pH	Equilíbrio térmico, Ótico Potenciométrico	-	-
Clorofila <i>a</i>	Espectofotométrico	mg.L <sup>-1</sup>	NUSH (1981)
DQO total e filtrada	Colorimétrico	mg.L <sup>-1</sup>	APHA (2012)
SSV	Gravimétrico	mg.L <sup>-1</sup>	APHA (2012)

### 3. Resultados e Discussão

A Figura 1 apresenta os valores de OD e pH durante todo o experimento.

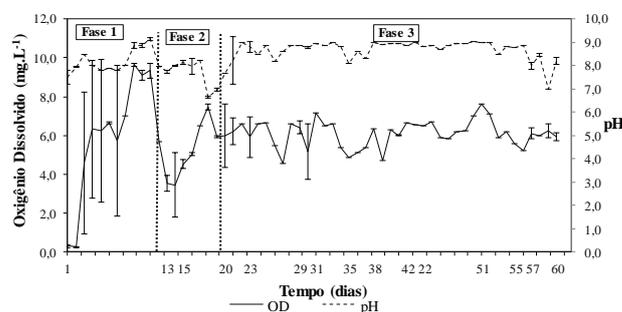


Figura 1. Valores de OD e pH ao longo do tempo de operação do fotobiorreator. Nota: A operação do fotobiorreator é representada em 3 fases. Fase 1: operação em batelada. Fase 2: período de ajuste de vazão. Fase 3: fase de estabilidade da operação em regime contínuo.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

A operação do fotobiorreator foi dividida em três fases, como observado na Figura 1. A Fase 1 corresponde ao período em que o fotobiorreator operou em regime batelada. Os valores médios de pH, OD e temperatura com seus respectivos erros e coeficiente de variação (CV) nesta fase foram, respectivamente,  $8,2 \pm 0,07$  (CV de 6,6%),  $5,9 \pm 0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  (CV de 54%) e  $25,4 \pm 0,09 \text{ }^\circ\text{C}$  (CV de 8,9%). A Fase 2, que compreende do 12º dia de operação ao 19º dia, corresponde ao início da operação do fotobiorreator em contínuo e a um período de ajuste de vazão. Os valores medidos de pH, OD e temperatura foram, respectivamente,  $7,7 \pm 0,6$  (CV de 7,5%),  $5,3 \pm 1,4 \text{ mg.L}^{-1}$  (CV de 26,7%) e  $24,4 \pm 1,1 \text{ }^\circ\text{C}$  (CV de 4,6%). A Fase 3 se inicia no 20º dia e finaliza no 60º dia de operação. Esta última fase caracteriza o momento de estabilidade da operação do fotobiorreator, que pode ser justificado pela menor variação diária dos valores de pH  $8,7 \pm 0,4$  (CV de 5%), OD  $6,1 \pm 0,7 \text{ mg.L}^{-1}$  (CV de 11%) e temperatura  $26,9 \pm 0,6 \text{ }^\circ\text{C}$  (CV de 2,2%), quando comparados às fases 1 e 2.

Os valores de pH também apresentados na Figura 3 encontraram-se na faixa de 7 a 9. De acordo com Park et al. (2011), o pH ideal para muitas algas de água doce é por volta de 8. O valor médio encontrado de pH para o fotobiorreator na Fase 3 ( $8,7 \pm 0,4$ ) foi próximo ao valor ideal acima citado.

A temperatura média encontrada na presente pesquisa, durante a Fase 3 também permaneceu dentro da faixa considerada ideal para cultivo de microalgas de acordo com S. P. Singh e P. Singh (2015).

Na Figura 2, têm-se os valores de clorofila a e SSV determinados para o fotobiorreator durante os experimentos. O maior valor de clorofila a foi de  $2,5 \pm 0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ , durante a Fase 3. Com relação ao SSV o valor médio durante a fase 3 foi de  $260 \pm 78 \text{ mg.L}^{-1}$ . Os valores de clorofila a e SSV medidos por Santiago et al. (2013) foram próximos aos obtidos na presente pesquisa, sendo  $1,5 \pm 1,2 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $2,1 \pm 1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de clorofila a, em suas LATs sem desinfecção UV e na LAT com

desinfecção UV, respectivamente e  $152 \pm 57 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $124 \pm 46 \text{ mg.L}^{-1}$  de SSV.

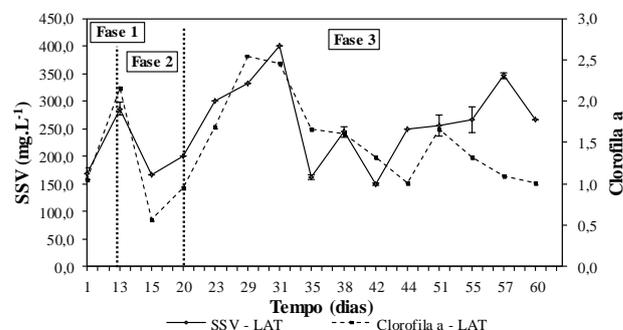


Figura 2. Clorofila a e SSV no fotobiorreator ao longo do tempo de experimento.

Os valores de DQO total para a água residuária sintética bruta, os valores de DQO filtrada para o fotobiorreator e o percentual de remoção de DQO estão apresentados na Figura 3.

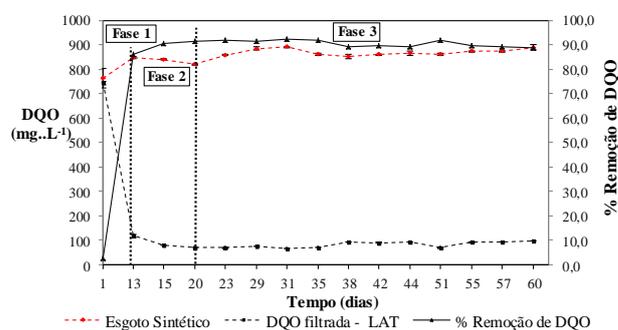


Figura 3. Valores de DQO na água residuária sintética afluenta ao fotobiorreator, DQO filtrada efluente ao fotobiorreator e percentual de remoção de DQO no fotobiorreator.

Os valores de DQO para a água residuária sintética bruta, afluenta ao fotobiorreator, encontraram-se na faixa de  $750\text{-}850 \text{ mg.L}^{-1}$ . O valor médio do percentual de remoção de matéria orgânica para o fotobiorreator, durante a Fase 3, e seu respectivo desvio padrão foi de  $91,1 \pm 1,3\%$  (CV de 1,4%). Assim, o sistema apresentou eficiência e estabilidade operacional durante toda a Fase 3 para a remoção de DQO. Ainda, os valores aqui medidos foram maiores que os apresentados na literatura para as LATs iluminadas pelo sol.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

Kim et al. (2014b) obtiveram  $85,4 \pm 5,1\%$  de remoção de DQO em sua LAT de 60 L operada em diferentes TDH (2, 4, 6 e 8 dias). Godos et al. (2009) obtiveram  $76 \pm 11\%$  de remoção na LAT de 464 L e TDH de 10 dias.

#### 4. Considerações finais

O sistema analisado apresentou estabilidade e eficiência na redução de DQO em água residuária sintética doméstica, alcançado um percentual de remoção de 90%.

#### 5. Referências Bibliográficas

APHA. Standard Methods for examination of water and wastewater. 22a ed, Washington: American Water Work Association, Water Environmental Federation, 2012. 1496 pp.

GODOS, I.; BLANCO, S.; ENCINA, P. A. G.; BECARES, E.; MUÑOZ, R. Long-term operation of high rate algal ponds for the bioremediation of piggery wastewaters at high loading rates. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 19, p. 4332–4339, 2009.

KIM, B. H.; KANG, Z.; RAMANAN, R.; CHOI, J. E.; CHO, D. H.; OH, H. M.; KIM, H. S. Nutrient removal and biofuel production in high rate algal pond using real municipal wastewater. *Journal of Microbiology Biotechnology*, v. 24, n. 8, p. 1123–1132, 2014b.

KIM, D. G.; LEE, C.; PARK, S. M.; CHOI, Y. E. Manipulation of light wavelength at appropriate growth stage to enhance biomass productivity and fatty acid methyl ester yield using *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, v. 159, p. 240–248, 2014a.

KIM, T. H.; LEE, Y.; HAN, S. H.; HWANG, S. J. The effects of wavelength and wavelength mixing ratios on microalgae growth and nitrogen, phosphorus removal using *Scenedesmus* sp. for wastewater treatment. *Bioresource Technology*, v. 130, p. 75–80, 2013.

LIU, J.; WU, Y.; WU, C.; MUYLAERT, K.; VUVERMAN, W.; YU, H. Q.; MUNOZ, R.; RITTMANN, B. Advanced nutrient

removal from surface water by a consortium of attached microalgae and bacteria: A review. *Bioresource Technology*, v. 241, p. 1127–1137, 2017.

NUSH, Netherlands. Norm (NEN 6520). Norma holandesa sobre determinação de clorofila a pelo método do etanol. 4 pp. 1981.

OECD: Guidelines for testing of chemicals simulation teste-aerobic sewage treatment. Technical Report. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, 1996.

OOMS, M. D.; DINH, C. T.; SARGENT, E. H. SINTON, D. Photon management for augmented photosynthesis. *Nature Publishing Group*, v. 7, p. 1–13, 2016.

PARK, J. B. K.; CRAGGS, R. J. Nutrient removal in wastewater treatment high rate algal ponds with carbon dioxide addition. *Water Science and Technology*, v. 63, n. 8, p. 1758–1764, 2011.

RAWAT, I.; KUMAR, R.; MUTANDA, T.; BUX, F. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, v. 88, n. 10, p. 3411–3424, 2011.

SANTIAGO, A. F.; CALIJURI, M. L.; ASSEMANY, P. P.; CALIJURI, M. C.; REIS, A, J, D. Algal biomass production and wastewater treatment in high rate algal ponds receiving disinfected effluent. *Environmental technology*, v. 34, n. 13–16, p. 1877–85, 2013.

SINGH, S. P.; SINGH, P. Effect of temperature and light on the growth of algae species : A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 50, p. 431–444, 2015.

VON SPERLING, M. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. 3 ed. Belo Horizonte: DESA-UFMG, 2005, 452p.

## OBTENÇÃO DE BIOMOLÉCULAS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ORIUNDAS DA HIDRÓLISE ALCALINA DA CASCA DE CAFÉ

Leite<sup>1</sup>, B.; Mendes<sup>1</sup>, D. V., Santos, M. S.<sup>1</sup>, Carmo, T. W. S.<sup>1</sup> e Sarrouh, B.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de São João del rei, Engenharia de Bioprocessos

<sup>2</sup> Universidade Federal de São João del rei, Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos.

E-mail: bsarrouh@ufs.edu.br

### 1. Introdução

O café (*Coffea arabica* L.) foi descoberto há mais de mil anos na região da Etiópia, sendo inserido na alimentação humana na forma de bebida e posteriormente em outros derivados alimentares (DURAN *et al.*, 2017). A popularidade deste grão pode ser associada ao seu efeito estimulante que pode ser atribuído a presença da cafeína em sua composição (ALVES *et al.*, 2009).

O Brasil é o maior exportador de café no mercado internacional, respondendo por cerca de 32% da produção mundial, em uma posição que se mantém há mais de 150 anos (SUPLICY, 2013). A alta produção de café ocasiona a geração de grandes volumes de resíduos na cadeia produtiva. Entre os diversos resíduos gerados, a casca do café, possui composição química favorável e semelhante à dos grãos, o que faz deste coproduto uma matéria de potencial interesse econômico (SOUZA *et al.*, 2005).

Segundo Moraes e coautores (2009), compostos fenólicos constituem uma das principais classes de antioxidantes naturais e são largamente distribuídos em grãos, cascas, sementes, dentre outros materiais. Portanto, como café possui compostos fenólicos mostra-

se como potencial objeto de estudo e intensifica sua projeção mercadológica e alternativas de aplicação. Em suma, esse trabalho propõe a obtenção de moléculas com atividade antioxidante obtidas por uma hidrólise alcalina de cascas de café, bem como a quantificação destas moléculas e verificação do seu efeito no desenvolvimento de leveduras.

### 2. Metodologia

#### 2.1 Obtenção do licor de cascas

O processo de hidrólise alcalina foi conduzido com as cascas de café “*in natura*” e secas naturalmente. Posteriormente, pesou-se 5,0 g de cascas secas em uma balança analítica que foram adicionadas a uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) com concentração de 4% p/v e proporção fixada em 1:10. A mistura de cascas e solução de hidróxido de sódio foi transferida para garrafas autoclaváveis e colocadas em autoclave a 120°C durante 30 minutos. Em seguida, o extrato de casca foi filtrado a vácuo e armazenado sob refrigeração a 4°C em garrafas âmbar. O filtrado dessa etapa, denominado como licor de cascas de café (ou

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

hidrolisado), foi utilizado no estudo desse trabalho.

## 2.2 Quantificação das moléculas fenólicas

Para determinação das moléculas fenólicas, determinou-se as moléculas fenólicas totais e moléculas específicas de flavonóides e taninos. Os fenóis totais são quantificados pelo método Folin-Ciocalteu com algumas alterações, conforme descrito por Slinkard e Singleton (1977). Enquanto, os flavonoides foram quantificados pelo método descrito por Arvouet-grand e coautores (1994), obtendo a massa em equivalentes em quercetina. Os taninos foram determinados pela metodologia apresentada por Brune et al (1991), obtendo-se o resultado em equivalentes de ácido gálico.

## 2.3 Avaliação da atividade antioxidante em *Saccharomyces cerevisiae*

O ensaio para avaliação da capacidade antioxidante da casca do café foi realizado com cepas de *Saccharomyces cerevisiae* na fase exponencial de crescimento. Uma alíquota de leveduras na concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL foi transferida para meios de cultivo com diferentes concentrações de licor da casca do café. As concentrações adotadas foram 25 g/L, 5g/L e 2,5 g/L de licor em meio YEPD completo, obtido com a adição de 2% de glicose, 1% de extrato de levedura e 2% de peptona. A alíquota de células foi mantida nesse meio à 28°C e em agitação mecânica por um período total de 72 horas. A cada 24 horas, retirava-se 100 µL desse meio com crescimento microbiano em diferentes concentrações, e diluía-se em 900 µL de água destilada. Depois transferiu-se para um tubo *ependorf* as células

diluídas e o corante azul de metileno na proporção 1:10, sendo necessário cerca de 10 de células coradas para preenchimento da câmara de Neubauer. Para a contagem de células, consideraram-se os quadrantes de maior graduação da câmara, com exclusão de células dispostas sobre as linhas de marcação.

## 3. Resultados e discussão

Os teores de moléculas fenólicas foram obtidos em mg/L, conforme descrito na tabela 1 abaixo:

Tabela I - Teor de fenóis totais, taninos e flavonóides em mg.100 g<sup>-1</sup>

Composto fenólico	Teor (mg.100 g <sup>-1</sup> )
Fenóis totais	3408±130
Flavonoides	615±80
Taninos	300±9

De acordo com Pinto (2002), a composição de fenóis é variável em decorrência do estágio de desenvolvimento do fruto. Alguns outros fatores podem influenciar nestes teores, como forma de cultivo, solo e condições climáticas podem afetar na composição na cultura de café. Além disso, é possível ressaltar que o método de extração pode interferir na quantidade de moléculas obtidas, conforme observado na literatura.

Ao final do tempo de cultivo, foi possível obter as seguintes curvas de crescimento:

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

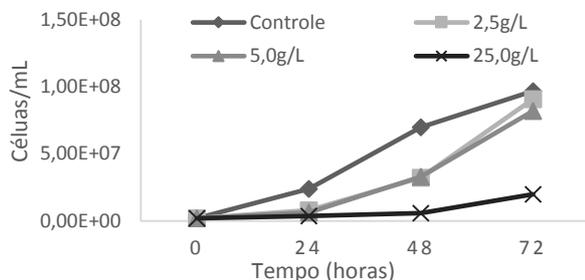


Figura I - Curvas de crescimento celular das amostras em análise em duplicata e média

Neste trabalho foi possível observar que o padrão de crescimento variou diretamente com a concentração de licor nas amostras. Soares (2013) denota a inibição do crescimento celular por compostos fenólicos oriundos do extrato da folha do araticum (*Syzygium cumini*), em diferentes estirpes de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. A diminuição do crescimento também ocorre em células de mamíferos, como demonstrado por Jardim (2007), que relata a inibição do crescimento celular em cultura de células da linhagem Caco-2 expostas a diferentes concentrações de compostos fenólicos derivados do extrato hidro alcoólico de romã.

Outra análise utilizada foi a comparação entre as taxas de viabilidade celular encontradas e o número de células viáveis em cada tempo de contagem. Os resultados estão descritos na figura II.

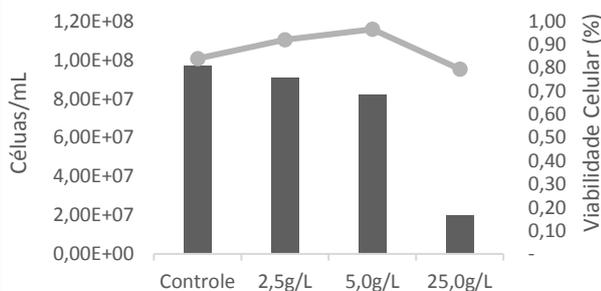


Figura II- Comparativo entre as escalas de viabilidade celular e o número de células viáveis.

Ao final do tempo de cultivo as amostras de 2,5 g/L e 5 g/L apresentaram quantidade de células mais próximas às amostras de Controle. Contudo, os valores de viabilidade celular foram mais elevados nessas amostras do que no Controle, onde a maior viabilidade foi apresentada na amostra de 5 g/L no valor de 97,0% ao final do experimento. Apesar de apresentar um valor de viabilidade celular não tão destoante das outras amostras, na concentração de 25 g/L foi quantificada a menor concentração final de células viáveis, não atingindo a fase exponencial esperada.

#### 4. Considerações Finais

A extração da casca do café utilizando hidrólise alcalina foi eficaz para a obtenção de moléculas bioativas, uma vez que se obteve 3408 mg.100 g<sup>-1</sup> em compostos fenólicos, entre eles taninos e flavonóides.

Nos ensaios com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* a presença do licor da casca do café nos meios de cultura teve um impacto direto no desenvolvimento celular, onde as culturas que mais se desenvolveram possuíam as menores concentrações do hidrolisado. Entretanto, foi observado que a viabilidade das células foi melhor nas amostras com meio de cultivo na concentração de 5 g/L, atingindo 97,0% ao final do tempo de cultivo.

De fato, a casca do café tem se tornando um destaque como um resíduo agroindustrial passível de reaproveitamento, podendo gerar substâncias de alto valor agregado, como antioxidantes. Esses compostos já são reconhecidos na literatura por suas propriedades e atuação em reações oxidativas, por isso são de grande interesse comercial. Além disso, possuem aplicabilidade em diferentes segmentos industriais, tais como os alimentícios, cosméticos, farmacológicos e outros.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

### 5. Agradecimentos

Nossos agradecimentos à UFSJ, FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro que possibilitou a presente pesquisa.

### 6. Referências

- ALVES, R.C.; CASA, S.; OLIVEIRA, B. Benefícios do café na saúde: mito ou realidade? **Química Nova**, v.32, n.8, 2009.
- ARVOUET-GRAND, A.; VENNAT, B.; POURRAT, A.; LEGRET, P. Standardization d'neextract de propolis et identification des principaux constituents. **Journal de Pharmacie de Belgique**, n.49, p. 462-468, 1994.
- DURAN, C.A.A.; TSUKI, A.; SANTOS, F.K.F.; MARTINEZ, S.T.; BIZZO, H.R.;
- JARDINI, F.A. PINTO, J.R.; MENDONÇA, R.M.Z.; MANCINI, D.A.P.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da romã (*Punica granatum*, L.) sobre células da linhagem Caco-2. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, n. 27, p. 80-83, 2007.
- REZENDE, C.M. Café: Aspectos gerais e seus aproveitamentos para além da bebida. **Revista Virtual Química**, v.9, n.1., 2017.
- SOARES, J.J. Avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo de extratos preparados a partir das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. 2013. 82 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, 2013.
- SOUZA, F.F.; SANTOS, J.C.; COSTA, J.N.; SANTOS, M.M. **Características das principais variedades de café cultivadas em Rondônia**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2004. 21 p.
- SUPLICY, E. M. Brasil se consolida na tradição de grande produtor mundial de café. **Visão Agrícola**, n.12, p. 124-126, 2013.
- SLINKARD, K.; SINGLETON, V.L. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. **American Journal of Enology and Viticulture**, n. 28, p. 49-55, 1977.
- MORAES, F.P., COLLA, L.M., Alimentos funcionais e nutraceuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n.2, P. 109-122, 2006.
- PINTO, N.A.V.D. **Avaliação química e sensorial de diferentes padrões de bebidas do café arábica cru e torrado**. 92 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.
- SOARES, J.J. **Avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo de extratos preparados a partir das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels**. 2013. 82 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, 2013.
- JARDINI, F.A. et al. Avaliação da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da romã (*Punica granatum*, L.) sobre células da linhagem Caco-2. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 27(supl.): 80-83, ago. 2007.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

## DEGRADAÇÃO DE FENOL POR *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADA DO LODO ATIVADO DE UMA INDÚSTRIA SIDERÚRGICA

Paulo R. P. Dias<sup>1</sup>, Tatiana O. Paiva<sup>1</sup>, Enio N. Oliveira Jr<sup>3</sup>, Ana M. Oliveira<sup>3</sup> e José C. Magalhães<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de São João Del-Rei - Programa de Pós-graduação em Tecnologias para o Desenvolvimento Sustentável. Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de São João Del-Rei – Engenharia de Bioprocessos. Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal de São João Del-Rei. Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos. Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil.

E-mail: pauloricardopdias@yahoo.com.br

### 1. Introdução

Os fenóis são compostos recalcitrantes de elevada toxicidade, que podem ter sérios impactos ambientais se forem descartados de maneira inadequada nos ecossistemas. Os compostos fenólicos são uma classe importante de contaminantes ambientais, pois estão presentes em muitos efluentes industriais, como indústrias farmacêutica e têxtil, refinarias, petroquímicas e siderúrgicas, defensivos agrícolas, resinas e papéis, entre outros (MIRANDA *et al.*, 2013; RODRIGUES, 2006; PASSOS *et al.*, 2008).

*Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo Gram-negativo que pode ser isolado de diferentes habitats, incluindo água, solo e plantas (JAY, 2005). São bactérias que vivem preferencialmente em um ambiente aeróbico, mas podem crescer em um ambiente anaeróbico na presença de nitrato (Madigan *et al.*, 2016). Bactérias do gênero *Pseudomonas* desenvolveram a capacidade de utilizar substratos tóxicos ao seu crescimento, como compostos fenólicos e benzeno. Portanto, esses microrganismos desempenham um papel muito importante na degradação de poluentes de áreas contaminadas e podem ser usados em técnicas de biorremediação. (KURBATOV *et al.*, 2006). A cepa de *Pseudomonas aeruginosa* utilizada nesta pesquisa foi isolada

de uma amostra de lodo ativado proveniente de uma indústria siderúrgica e, por esse motivo, a cepa já estava bem adaptada à presença de fenol, uma vez que os efluentes siderúrgicos apresentam altas concentrações desse composto. Assim, esta linhagem apresenta um grande potencial no tratamento de efluentes fenólicos e na recuperação de áreas contaminadas por rejeitos fenólicos.

O objetivo deste trabalho foi estudar a capacidade de degradação do fenol por uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* isolada do lodo ativado de uma indústria siderúrgica, identificando as melhores condições para remoção de fenol pela linhagem bacteriana estudada.

### 2. Material e métodos

#### 2.1. Cinética do crescimento microbiano e degradação de fenol

O crescimento celular pode ser medido em espectrofotômetro em razão do espalhamento de luz ocasionado pela presença das células. Sendo assim, foi feito o acompanhamento do crescimento microbiano por meio da leitura da absorbância (600 nm) e por meio de uma curva analítica relacionando absorbância e concentração de células, foi construído uma

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

outra curva relacionando a concentração de células e o tempo. O pH do meio foi monitorado a 6,4 durante o ensaio utilizando tampão fosfato. A composição do meio empregue neste estudo é em mg L<sup>-1</sup>: glicose (1000), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (2,5), CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (3,8), MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,14), Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>).6H<sub>2</sub>O (0,60), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (100) e fenol (250). A determinação do fenol foi também feita ao longo do ensaio cinético para avaliar a degradação deste composto ao longo do tempo.

## 2.2. Estudo da degradação do fenol pela linhagem *Pseudomonas aeruginosa*

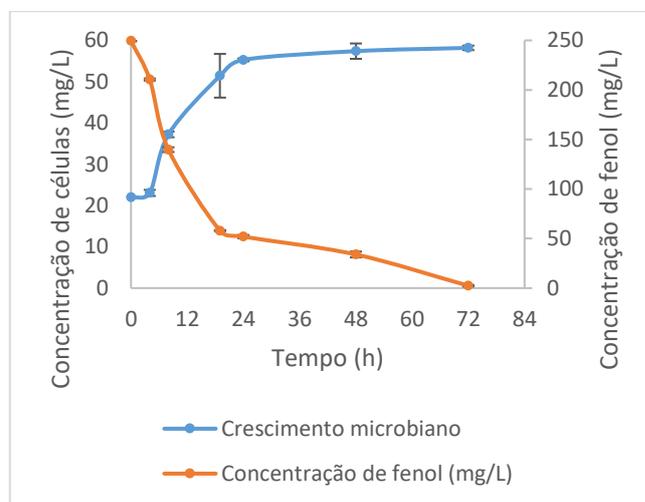
Para avaliar as melhores condições de biodegradação de fenol, foi utilizado um planejamento estatístico, apresentando quatro pontos axiais e triplicata no ponto central. Com o objetivo de verificar se o fenol sofreu degradação durante o período de fermentação, foi realizado um teste adicional (controle abiótico), cuja composição do meio é a mesma dos pontos centrais do planejamento experimental. As variáveis independentes estudadas foram concentração de fenol e pH. A Tabela 1 mostra o planejamento experimental onde a concentração de fenol e o pH foram variados. A composição do meio é a mesma usada no ensaio cinético, com exceção do fenol que teve as concentrações variadas. O pH do meio foi controlado utilizando tampão fosfato.

**Tabela 1** - Planejamento experimental variando a concentração de fenol e o pH.

Ensaio	Código	Fenol (mg L <sup>-1</sup> )	pH
1	-1, -1	108	5,8
2	-1, +1	108	7,0
3	+1, -1	392	5,8
4	+1, +1	392	7,0
5	-1,41, 0	50	6,4
6	+1,41, 0	450	6,4
7	0, -1,41	250	5,5
8	0, +1,41	250	7,3
9	0, 0	250	6,4
10	0, 0	250	6,4
11	0, 0	250	6,4

## 3. Resultados e discussão

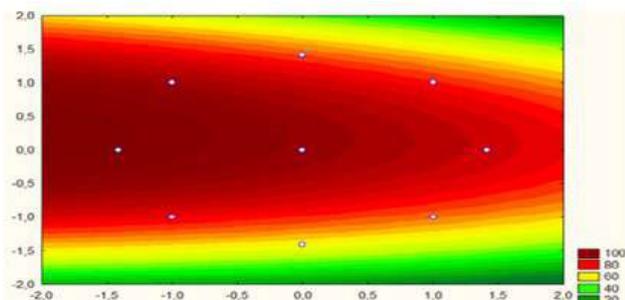
A Figura 1 mostra o resultado obtido no ensaio cinético da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e, como pode ser visto, a cepa removeu 100% do fenol a um teor inicial de 250 mg L<sup>-1</sup>, em 72 horas, degradando-o desde o início do processo de fermentação. Este resultado indica que essa bactéria é capaz de degradar o fenol, apresentando um grande potencial na remoção do composto.



**Figura 1** - Cinética do crescimento microbiano e de degradação do fenol no período de 72 horas, temperatura de 30 ° C, pH de 6,4 e agitação de 150 RPM para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*.

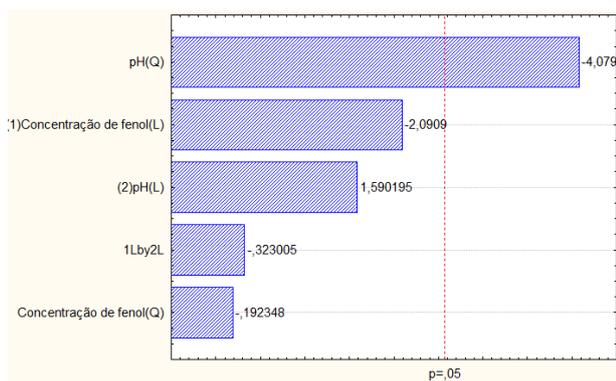
Como pode ser visto na curva de contorno da Figura 2, para obter uma melhor degradação do fenol pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, o pH deve ser controlado em 6,4 (ponto central). Pode ainda ser visto que quanto menor a concentração inicial de fenol, melhor a percentagem de remoção do composto. Isto é facilmente justificável porque, na presença de compostos tóxicos como o fenol, o crescimento microbiano é afetado, e quanto maior a concentração do composto recalcitrante, maior o efeito inibitório sobre o microrganismo. A cepa de *Pseudomonas aeruginosa* também apresenta boa eficiência na remoção de fenol, mesmo quando apresenta maiores concentrações iniciais de fenol.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil



**Figura 2** - Curva de contorno da remoção de fenol em relação à concentração inicial de fenol e pH para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*.

Analisaram-se os dados estatisticamente obtendo-se os diagramas de Pareto e os valores da ANOVA, mostrados na figura 3 e tabela 2, respectivamente.



**Figura 3** - Diagrama de Pareto da remoção de fenol pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* em relação à concentração inicial de fenol e pH.

**Tabela 2** - Valores da ANOVA para a remoção de fenol pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* em relação à concentração inicial de fenol e pH.

Fonte	SS	df	MS	F <sub>calc</sub> *	R <sup>2</sup>
<b>Regressão</b>	2577,2	1	2577,2	44,56	0,83
<b>Resíduo</b>	520,5	9	57,8		
<b>Total</b>	3097,7	10	-		

\*F<sub>calc</sub> = 44,56; F<sub>tab</sub> = F<sub>(1;9;0,05)</sub> = 5,12

SS = Soma dos Quadrados

df = Grau de liberdade

MS = Quadrado Médio

Como pode ser visto na figura 3, somente o parâmetro pH (quadrático) possui

valor estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ). As demais variáveis como concentração inicial de fenol e as interações entre as variáveis são menos significativas nestas condições de processo dentro dos intervalos de confiança ( $p < 0,05$ ). Estes parâmetros causam menor influência nos resultados, mas podem possuir maior influência sob outras condições.

Por meio da Tabela 2, obtém-se o valor de F calculado (F<sub>calc</sub>), sendo que como F<sub>calc</sub> é maior que F<sub>tab</sub> (F tabelado), o modelo matemático é estatisticamente significativo e preditivo. Além disso, o valor de R<sup>2</sup> de 0,83 mostra o bom ajuste do modelo.

A Tabela 3 mostra os coeficientes de regressão para a remoção de fenol pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Em vermelho estão destacados os parâmetros significativos. É possível notar que a variável, pH (quadrática) possui efeito negativo significativo, no nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ), sobre a variável resposta remoção de fenol.

**Tabela 3** – Coeficientes de regressão e p valor para a remoção de fenol pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*

	Regressão	p_valor
<b>Média/Interação</b>	<b>98,9024</b>	<b>0,000014</b>
X <sub>1</sub> (L)	-7,5428	0,090796
X <sub>1</sub> (Q)	-0,8259	0,855038
X <sub>2</sub> (L)	5,7366	0,172662
X <sub>2</sub> (Q)	<b>-17,5145</b>	<b>0,009549</b>
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	-1,6479	0,759762

\* X<sub>1</sub>: Concentração inicial de Fenol, X<sub>2</sub>: pH; L: termo linear; Q: termo quadrático.

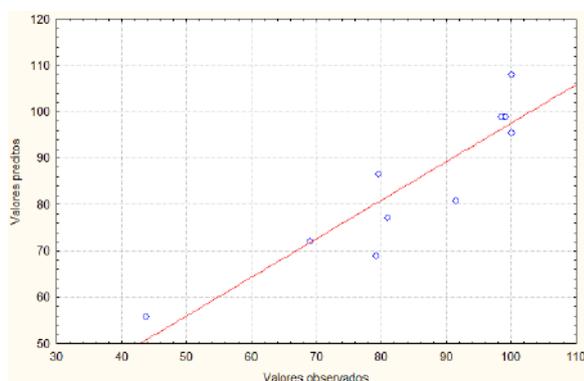
A partir dessas análises, é possível definir a equação 1:

$$Rf (\%) = 98,9024 - 17,5145 x_2^2 \quad (1)$$

Onde, Rf é o percentual de remoção de fenol x<sub>2</sub> é o pH.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

A confiabilidade da Equação 1, pode ser verificada obtendo os valores preditos pelo modelo matemático descrito anteriormente. Na figura 4, são mostrados os valores preditos em relação aos valores observados. A partir da análise da figura 4, pode-se concluir que o modelo matemático prevê os resultados obtidos satisfatoriamente, mesmo havendo pontos em que há uma diferença maior entre os resultados obtidos experimentalmente e os valores obtidos por meio da equação 1.



**Figura 4** – Valor predito versus valor observado para a variável Remoção de fenol (%) nos ensaios com a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*.

### 3 - Conclusão

Este trabalho traz uma possibilidade ou um processo biotecnológico de grande interesse ambiental, visto que, o fenol é um composto tóxico recalcitrante de grande impacto ambiental e esta bactéria prospectada do lodo ativado de uma indústria siderúrgica está apta à biodegradação de compostos fenólicos, podendo ser utilizada no aprimoramento e ou desenvolvimento de técnicas de tratamento de efluentes e na recuperação de solos contaminados por esses compostos. Para que ela possa metabolizar altas concentrações desses compostos, assim como, alcançar percentuais mais elevados de remoção, os estudos e a pesquisa devem continuar. O tratamento estatístico se mostrou eficaz em mostrar a influência das variáveis independentes sobre remoção de fenol.

### 4 - Referências bibliográficas

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. Editora Artmed. 6ªed. 2005.

MADINGAN, M.T.; MATINKO, J.M.; BENDER, K.S.; BUCKLEY, D.H.; STAHL, D.A. **Microbiologia de Brock**. 14ªed. Porto Alegre, RS, Artmed, 2016.

MIRANDA, R. C. M.; GOMES, E. B.; PEREIRA Jr., N.; MARIN-MORALES, M. A.; MACHADO, K. M. G.; GUSMÃO, N. B. Biotreatment of textile effluent in static bioreactor by *Curvularia lunata* URM 6179 and *Phanerochaete chrysosporium* URM 6181. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 361-367, 2013.

PASSOS, C.V.; BURKERT, J.F.M.; KALIL, S.J.; BURKERT, C.A.V. Biodegradação de fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus sp.* isolada de um solo contaminado do sul do Brasil. **Química Nova**. v. 32, n.4, p. 950–954, 2008.

RODRIGUES, K.A. **Uso de reatores biológicos com fungos para remoção de fenol de água residuária sintética**. 130 p. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2006.

### 5 - Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro do CNPq – Conselho Nacional para Desenvolvimento Tecnológico e Científico, FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, e PPGTDS - UFSJ – Programa de Pós-Graduação em Tecnologias para o Desenvolvimento Sustentável da Universidade Federal de São João Del-Rei.

### PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DO AMIDO OBTIDO DA FRUTA-DE-LOBO (*Solanum lycocarpum*).

**Carmo<sup>1</sup>, M. R. A.; Ribeiro<sup>1</sup>, T. R.; Nunes<sup>2</sup>, T. H. H.; Oliveira<sup>3</sup>, A. M. e Oliveira Júnior<sup>3</sup>, E. N.**

<sup>1</sup> Universidade Federal de São João Del Rei - UFSJ / CAP, Programa de pós-graduação em tecnologias para o desenvolvimento sustentável- Mestrado em Ciências com ênfase em desenvolvimento de tecnologias sustentáveis.

<sup>2</sup> Universidade Federal de São João Del Rei - UFSJ / CAP, Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos – Engenharia de Bioprocessos.

<sup>3</sup> Universidade Federal de São João Del Rei São João del Rei, Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos – Engenharia de Bioprocessos.

E-mail: carmo.mariana@ymail.com e eniobio@ufsj.edu.br

#### ***1-Introdução***

A produção de etanol a partir de biomassa amilácea é atualmente considerada uma alternativa viável e promissora para a substituição dos combustíveis fósseis, principalmente o petróleo que além de ser um recurso finito, contribui com o agravamento do efeito estufa com a emissão de gases poluentes. Diferentes matérias-primas podem ser utilizadas na produção de etanol. (ADITYA et al, 2016).

A *Solanum Lycocarpum*, pertencente à família da solanácea é popularmente conhecida como fruta-de-lobo. Essa espécie é capaz de crescer e se desenvolver em ambientes com condições desfavoráveis como solos pobres em nutrientes e acidificados. Ela ocorre naturalmente em todo o Brasil tropical e subtropical, com predominância nos

cerradões, campos cerrados e cerrados. A fruta-de-lobo tem uma grande quantidade de amido, portanto, é uma matéria-prima promissora para a produção de etanol (OLIVEIRA-FILHO e OLIVEIRA, 1988).

A fermentação alcoólica é realizada por micro-organismos. Algumas bactérias, leveduras e fungos são capazes de realizar esse processo. A cepa de levedura industrial PE-2 é a mais comumente utilizada na fermentação do bioetanol, devido às suas características como alta seletividade, baixo acúmulo de subprodutos, alto rendimento de etanol e elevada taxa de fermentação (AMORIM et al., 2011).

Diante desse contexto, o presente trabalho propõe a fermentação de açúcares fermentescíveis, obtidos do amido da fruta-

de-lobo, para a produção de etanol utilizando a cepa comercial da levedura *Sacharomyces cerevisiae*, (PE-2).

### 2 – Material e Métodos

#### 2.1 Hidrólise Enzimática

A hidrólise do amido que foi obtido da fruta-de-lobo por meio do método de decantação sucessiva foi realizada por duas etapas consecutivas: liquefação e sacarificação. Enzimas comerciais produzidas pela Novozymes A / S foram usadas. A solução de água e a enzima Liquozyme SC DS (alfa-amilase) foi aquecida a 85 ° C e a suspensão de amido (16% p / v) foi gradualmente adicionada até à sua completa gelatinização. Após 2h30min de reação, a temperatura foi reduzida para 65 ° C para iniciar o processo de sacarificação. Nesta fase, a enzima Spirizyme Fuel HS (gluco-amilase) foi adicionada. A reação foi incubada à temperatura indicada com agitação rotativa a 140 rpm durante as 24 horas.

#### 2.2 Fermentação alcoólica

O inóculo foi preparado pelo cultivo da levedura em frascos erlenmeyer contendo 100 mL de meio sintético (pH 5,0) composto por sacarose e outros nutrientes (Tabela 1). As células foram cultivadas em incubadora shaker refrigerado New Brunswick (Series – I 26) a 180 rpm a 30 ° C por 24h até atingir a fase estacionária.

Tabela 1 – Composição do meio inóculo para crescimento das leveduras.

NUTRIENTES	CONCENTRAÇÃO (%m/v)
Extrato de Levedura	1
Sacarose	2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	0,1140
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,024
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,00104
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,0028

Fonte: Oliveira, 2011.

Posteriormente, as leveduras foram recuperadas por centrifugação (Centrifuga Eppendorf 5920 R) a 3500 rpm por 20 minutos, lavadas e ressuspendidas no meio de fermentação (pH 5,0). Para formulação do meio de fermentação, o material obtido a partir da hidrólise que apresentava 12,5% de Brix foi acrescido de alguns nutrientes (Tabela 2). A fermentação foi realizada adicionando o hidrolisado rico em glicose e suplementado com nutrientes em frascos erlenmeyers colocados em incubadora com movimento rotatório shaker refrigerado New Brunswick (Series – I 26) a 50 rpm, 30°C por 11h.

Tabela 2 – Composição do meio inóculo para crescimento das leveduras.

NUTRIENTES	CONCENTRAÇÃO (%m/v)
Açúcar redutor	12,5
Extrato de Levedura	0,5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	0,1140
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,024
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,00104
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,0028
Ureia	0,1

Fonte: Oliveira, 2011.

A fermentação foi conduzida por 11 horas e foram retiradas alíquotas nos intervalos de tempo 0h, 1h, 3h, 5h, 7h, 9h e

11h. As amostras foram centrifugadas (Centrifuga Eppendorf 5920 R) a 3500 rpm a 4 °C por 20 min. Os sobrenadantes das amostras livres de células foram congelados para análises posteriores.

O processo de fermentação foi conduzido monitorando os seguintes parâmetros, açúcares redutores ( $\text{g L}^{-1}$ ), crescimento celular ( $\text{g L}^{-1}$ ), e concentração de bioetanol ( $\text{g L}^{-1}$ ). Os açúcares redutores foram determinados utilizando o método desenvolvido por Noelting & Bernfeld (1948), a concentração celular foi determinada por gravimetria da biomassa e a concentração de bioetanol por meio da técnica de microextração em fase sólida (SPME) associada a cromatografia gasosa.

### 3 – Resultados e discussões

#### 3.1 – Açúcares redutores

A concentração de glicose no hidrolisado foi de 12,5 % de Brix. Essa concentração no hidrolisado mostra que a fruta-de-lobo é uma matéria-prima com alto potencial para a produção de etanol.

#### 3.2 Fermentação alcoólica

A Tabela 3 apresenta a evolução das concentrações de AR, biomassa e etanol durante o processo fermentativo utilizando a levedura PE-2.

Tabela 3 - Teores de AR, sólidos solúveis, biomassa e etanol ao longo do tempo para a cepa de levedura PE-2.

T (h)	AR ( $\text{g L}^{-1}$ )	BIOMASSA ( $\text{g L}^{-1}$ )	ETANOL ( $\text{g L}^{-1}$ )
0	114,99	52,68	0
1	102,97	102,23	11,93
3	76,11	103,97	12,48
5	59,47	106,20	32,55
7	23,15	116,74	33,93
9	10,22	101,83	42,55
11	9,75	96,51	41,82

\*T = Tempo; AR = açúcar redutor

Pode-se observar que o valor máximo encontrado para a produção de etanol foi de  $42,55 \text{ g L}^{-1}$  em 9h de processo fermentativo (Tabela 3). A levedura PE-2 é uma cepa industrial utilizada na produção de etanol em grande escala com ciclos repetitivos de fermentação. Em escala laboratorial, com fermentação em batelada simples como a realizada no presente trabalho, a levedura se mostrou com bom desempenho.

Guigou (2012), realizando a fermentação alcoólica utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* a partir do amido de batata-doce (12% m/v) obteve  $39 \text{ g L}^{-1}$  após 14 h de fermentação. Isso mostra que o amido obtido da fruta-de-lobo pode ser uma fonte alternativa para a produção de etanol.

A partir dos dados da Tabela 3 foi construído o gráfico com o agrupamento dos perfis de concentração de açúcares redutores (AR), concentração de biomassa (X), concentração de etanol (E) para a cepa de levedura PE-2 (Figura 1). Por meio deste

perfil visualiza-se o comportamento cinético da fermentação alcoólica, conduzida em batelada simples, e evidencia-se a variação das concentrações de células, açúcares redutores (AR), e etanol durante a fermentação.

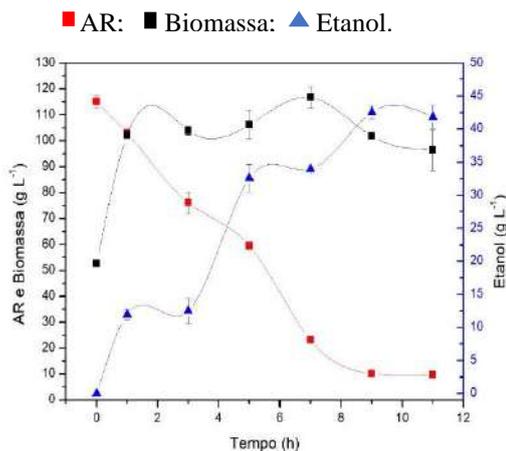


Figura 1 - Perfil da produção de etanol e biomassa e consumo de açúcares redutores em função do tempo para a levedura PE-2.

Analisando a Figura 1 observa-se que a relação estabelecida entre a concentração de substrato, concentração de produto formado e concentração celular durante a fermentação indica que este processo fermentativo ocorreu de forma adequada e ilustra bem o perfil cinético das fermentações.

Nota-se que há um consumo de açúcar redutor concomitantemente com o aumento da produção de etanol. O processo fermentativo iniciou com 114,99 g L<sup>-1</sup> de açúcar redutor e no fim (11h) decresceu para 9,75 g L<sup>-1</sup>. Isso indica que quase todo o substrato foi consumido pela levedura durante a fermentação. Já a maior concentração de etanol foi alcançada em 9h de processo fermentativo, com tendência de estabilização em 11h. Sendo assim, podemos inferir que a fermentação poderia ser interrompida em 9h quando se alcançou a máxima concentração do produto de interesse

#### 4 – Conclusão

Por meio do acompanhamento dos principais parâmetros durante o processo fermentativo do hidrolisado concluiu-se que a fermentação utilizando a cepa de levedura PE-2 se desenvolveu de maneira esperada, indicada pelo consumo quase que total dos açúcares fermentescíveis, aumento da biomassa e produção de etanol. A produção de bioetanol a partir dos açúcares redutores liberados durante a hidrólise enzimática do amido da fruta-de-lobo se mostrou interessante e pode ser uma alternativa de fonte amilácea para essa produção.

#### 5 – Referências bibliográficas

- ADITIYA, H. B.; MAHLIA, T. M. I.; CHONG, W. T.; NUR, H.; SEBAYANG, A. H. Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. v. 66. p. 631-653, 2016.
- AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; CASTRO, J.V.O.; BUCKERIDGE, M.S.; GOLDMAN, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 91, p. 1267-1275, 2011.
- GUIGOU, M. "Producción de bioetanol combustible a partir de boniato". Tesis de maestría, Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias, 2012.
- OLIVEIRA FILHO, A. T.; OLIVEIRA, L. C. A. Biologia floral de uma população de *Solanum lycocarpum* St Hil. (solanaceae) 1988. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v.11, n.1/2, p.23-32.

#### 6 – Agradecimentos

Agradecemos ao apoio da CAPES, CNPQ e FAPEMIG.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

## PRODUÇÃO DE BIOCÁRVÃO PROVENIENTE DO CÔCO VERDE PARA A REMOÇÃO DO HORMÔNIO 17 $\alpha$ -ETINILESTRADIOL

Emerenciano<sup>1</sup>, A. L. S.; Almeida<sup>1</sup>, C. P. Bernardes-Silva<sup>2</sup>, A. C.; Quintão<sup>3</sup>, C.M.F.; Augusti<sup>4</sup>, R.; Urzedo<sup>2</sup>, A. P. F. M.

Apresentador: Ana Luiza dos Santos Emerenciano

<sup>1</sup> Universidade Federal de São João Del-Rei, graduanda em Engenharia de Bioprocessos

<sup>2</sup> Universidade Federal de São João Del-Rei, Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos

<sup>3</sup> Universidade Federal de São João Del-Rei, Departamento de Engenharia Química

<sup>4</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Química

E-mail:

analuizaemerenciano@hotmail.com

### 1. Introdução

Fármacos como o 17 $\alpha$ -etinilestradiol são contaminantes emergentes que aumentam a cada ano nos resíduos hídricos devido a sua presença em anticoncepcionais. Esse hormônio é conhecido como um desregulador endócrino (DE), ou seja, um composto capaz de interferir na resposta da atividade hormonal de seres vivos. Como os tratamentos de esgoto convencionais não são eficazes para remoção de hormônios em águas residuais, a adsorção é um processo que pode auxiliar na remoção destas substâncias. Assim, neste trabalho, estudou-se o potencial de remoção do 17 $\alpha$ -etinilestradiol de sistemas aquosos através da adsorção em biocárvão produzido a partir da pirólise da casca do côco verde. O consumo de água de coco vem crescendo cada vez mais com o passar dos anos, acarretando assim, um acúmulo excessivo de resíduos e o descarte inadequado do mesmo. Desta forma, utilizar esta biomassa em processos adsorptivos torna-se uma solução para o reaproveitamento de tais resíduos.

### 2. Materiais e Métodos

#### 2.1. Obtenção da biomassa

O biocárvão foi produzido a partir dos resíduos da casca do côco verde pelo processo de pirólise, realizada a 500 e 800°C.

#### 2.2. Preparação da biomassa

A biomassa, inicialmente, foi segmentada em partes menores e arranjada em bandejas, as quais foram colocadas em uma estufa para aquecimento durante 48 horas em temperatura de 90°C. Após esta etapa, o material foi macerado e dividido em três partes: uma parte permaneceu in natura, a outra foi submetida a pirólise a 500 °C e finalmente, a terceira parte foi submetida a pirólise de 800°C.

#### 2.3. Caracterização físico-química dos materiais

Para a biomassa in natura de côco verde e os dois biocárvões produzidos a partir da biomassa foram realizadas as seguintes caracterizações: densidade total, teor de cinzas, pH, ponto de carga zero (PCZ).

#### 2.4. Densidade total

De acordo com Guimarães (2006), foi possível calcular a densidade total da biomassa e dos biocárvões através da relação massa/volume. Inicialmente, pesou-se uma proveta de 10 mL em uma balança analítica. Na seguinte etapa, a proveta foi preenchida pelo material até 5 mL. Por último, foi possível encontrar a massa do material em um volume de 5 mL pesando a proveta novamente. Esta caracterização foi realizada em triplicata. A

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

densidade total pode ser calculada a partir da seguinte equação:

$$d = \frac{M}{V} \quad (1)$$

Onde,

d= densidade total (g/mL),

M= massa do material em estudo,

V= volume ocupado (mL)

### 2.5. Teor de cinzas

Para obter o teor de cinzas dos materiais, foi seguida a Norma JIS K 147 (GUIMARÃES, 2006). Inicialmente, em um cadinho previamente tarado, pesou-se 1 g do material em estudo e o mesmo foi aquecido em forno mufla a 900°C durante o período de 1h. Após o presente processo, o cadinho foi retirado e resfriado. Posteriormente o material foi novamente pesado, obtendo-se a massa final. Esta caracterização foi realizada em triplicata. Para a obtenção do teor de cinzas, utilizou-se a seguinte equação:

$$C_z = \frac{R}{M} \times 100(2)$$

Onde:

Cz = teor de cinzas (%)

R = massa do resíduo após calcinação (g)

M = massa do material (g)

### 2.6. pH

O potencial hidrogeniônico (pH) foi medido através da Norma JIS K 147 adaptada, o qual em um erlenmeyer de 200 mL, adicionou-se 100 mL de água destilada e 1g do material em estudo. Esta solução foi submetida a aquecimento até atingir a ebulição. Após o início da ebulição, o sistema foi mantido por 5 minutos a mais no aquecedor. Ao atingir os 5 minutos, a solução foi retirada do aquecedor e mantida em repouso até atingir a temperatura ambiente. Então, adicionou-se mais 100 mL de água destilada para fazer a medição do pH. Esta caracterização foi realizada em triplicata.

### 2.7. PCZ

Para medir o ponto de carga zero (PCZ), foi utilizado o “experimento dos onze pontos” que consiste em medir o pH final das soluções. Em

um béquer de 100 mL, adicionou-se 50 mg de material e 50 mL de água destilada. Em seguida, foi medido seu pH inicial. Para ajustar os valores iniciais de pH (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 e 12), utilizou-se soluções 0,1 mol. L<sup>-1</sup> de NaOH (para atingir valores básicos) ou HCl (para atingir valores 12 ácidos). Após essa etapa, deixou-se em repouso as soluções por 24 h, e mediu-se o pH final. Esta caracterização foi realizada em triplicata. A partir dos valores encontrados, tanto de pH inicial quanto de pH final, foi possível obter o gráfico pH inicial versus pH final e a partir disso, é encontrado o PCZ, que indica em qual valor de pH a superfície caracteriza-se como tampão.

### 2.8. Testes de adsorção

Os testes de adsorção foram realizados utilizando o 17 $\alpha$ -etinilestradiol de acordo com o planejamento experimental apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. – Planejamento fatorial

Número do experimento	Massa de adsorvente	Tempo	Concentração do 17 $\alpha$ -etinilestradiol
1	30 mg	15 min	20 mg
2	30 mg	15 min	60 mg
3	30 mg	45 min	20 mg
4	30 mg	45 min	60 mg
5	70 mg	15 min	20 mg
6	70 mg	15 min	60 mg
7	70 mg	45 min	20 mg
8	70 mg	45 min	60 mg
9	16 mg	30 min	40 mg
10	84 mg	30 min	40 mg
11	50 mg	5 min	40 mg
12	50 mg	55 min	40 mg
13	50 mg	30 min	6,4 mg
14	50 mg	30 min	73,6 mg
15(C)	50 mg	30 min	40 mg
16(C)	50 mg	30 min	40 mg
17(C)	50 mg	30 min	40 mg

O sistema permaneceu em temperatura ambiente e agitação constante utilizando-se agitadores e barras magnéticas. Depois de atingir o tempo de equilíbrio de adsorção, a solução foi filtrada primeiramente com filtros de papel e em seguida utilizou-se filtros de seringa 0,45  $\mu$ m e a concentração residual de

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

17 $\alpha$ -etinilestradiol foi analisada por espectrofotometria UV-Vis em  $\lambda = 280$  nm.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Densidade, teor de cinzas e pH

Observando os valores da tabela 3, podemos perceber que a temperatura de pirólise influenciou os valores de densidade, como podemos observar para os biocarvões de 500 e 800°C. O biocarvão de 800 °C obteve um valor de densidade menor, já que altas temperaturas favorecem a volatilização dos grupos funcionais presentes na estrutura carbonácea e perda de massa devido a alta temperatura submetida. O biocarvão de 500°C apresentou maior densidade se comparado ao biocarvão de 800°C, devido a menor perda de massa, já que foi exposto a uma temperatura mais baixa.

O teor de cinzas está relacionado com a presença de vários minerais como cálcio, potássio, fósforo, magnésio. O teor de cinzas dos biocarvões foi maior que o teor de cinzas da biomassa, sendo um resultado já esperado visto que o processo de pirólise degrada os constituintes da biomassa aumentando o teor de cinzas.

O tipo de tratamento, como a pirólise para os biocarvões, pode modificar a superfície da biomassa, justificando assim que os biocarvões apresentaram um pH alcalino e a biomassa pH ácido.

Tabela 2: Densidade, teor de cinzas e pH

Material	Densidade (g.mL <sup>-1</sup> )	Teor de cinzas (%)	pH
Biomassa	0,33	4,56	5,25
Biocarvão 500°C	0,44	24,5	10,27
Biocarvão 800°C	0,38	45,13	10,05

#### 3.2. PCZ

Segundo Marin et al (2015), quando o valor de pH é menor que o PCZ, há predominância de cargas elétricas positivas na superfície do material, representando a capacidade de troca de ânions, uma condição significativa de adsorção de moléculas aniônicas; já se o pH

caracteriza-se maior que o valor de PCZ, ocorre um ambiente favorável para a capacidade de troca catiônica. A tabela 3 abaixo mostra os valores de pH e pH<sub>PCZ</sub>

Tabela 3: pH ePCZ

Material	pH	PCZ
Biomassa	5,25	7
Biocarvão 500°C	10,27	8
Biocarvão 800°C	10,05	9,45

De acordo com a tabela acima, pode-se observar que os valores de pH dos biocarvões são maiores que o PCZ, apresentando assim as superfícies carregadas negativamente, favorecendo a adsorção de cátions. Já o pH da biomassa foi menor que seu PCZ, indicando que sua superfície apresenta-se eletricamente positiva, favorecendo a adsorção de ânions.

#### 3.3. Testes de Adsorção

Após as amostras passarem pelos testes de adsorção, foi possível medir a porcentagem de hormônio adsorvido pela biomassa e pelos biocarvões, como observado na tabela 4.

Tabela 4: Porcentagem de adsorção do 17 $\alpha$  etinilestradiol

Número do experimento	Biomassa <i>in natura</i>	Biocarvão 500°C	Biocarvão 800° C
1	25,28	19,59	35,87
2	11,46	71,51	43,26
3	44,76	81,12	100
4	83,21	20,36	44,53
5	36,37	43,36	63,64
6	66,93	11,71	56,49
7	87,42	100	100
8	80,41	45,30	60,31
9	83,85	33,47	62,70
10	63,08	63,08	73,85
11	55,39	56,93	71,16
12	61,16	34,62	100
13	20	11,12	34,45
14	35,99	40,18	42,83
15(C)	61,37	12,13	47,73
16(C)	41,67	19,32	44,70
17(C)	41,67	17,43	53,04

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

Os experimentos mostraram que a predominância de cargas nas superfícies da biomassa in natura e dos biocarvões de 500 e 800°C influenciaram diretamente na adsorção do presente hormônio, onde a biomassa in natura apresentou em sua superfície predominância de cargas positivas, enquanto os biocarvões de 500 e 800°C, apresentaram superfície com cargas negativas. A biomassa in natura se mostrou um excelente adsorvente apesar de não receber nenhum tratamento prévio, devido a estrutura química do 17 $\alpha$ -etinilestradiol. Já os biocarvões foram prejudicados na adsorção justamente por apresentarem cargas negativas. Mas apesar disso, o biocarvão de 800°C obteve um resultado significativo na remoção do 17 $\alpha$ -etinilestradiol, visto que o aumento da temperatura no tratamento térmico aumenta a capacidade de adsorção. Quanto mais elevada a temperatura, mais poroso se torna o adsorvente, aumentando, conseqüentemente, sua área superficial.

Verificou-se que dentre os parâmetros analisados no processo adsorptivo utilizando o biocarvão de 800°C, o tempo de reação e a interação tempo/[etinilestradiol] foram significativos ao nível de confiança de 95%, como pode ser observado pelo gráfico de Pareto representado na figura 1. Pelo gráfico pode-se observar a que quanto maior o tempo de reação, maior taxa de adsorção é obtida. A interação tempo/[etinilestradiol] teve um efeito negativo, indicando que quanto menor o pH e maior o tempo de reação, maior é a porcentagem de adsorção.

Os parâmetros avaliados (massa de adsorvente, tempo de reação e concentração de hormônio) nos processos adsorptivos envolvendo a biomassa in natura e o biocarvão pirolisado a 500°C não foram estatisticamente significativos dentro dos valores estudados neste trabalho.

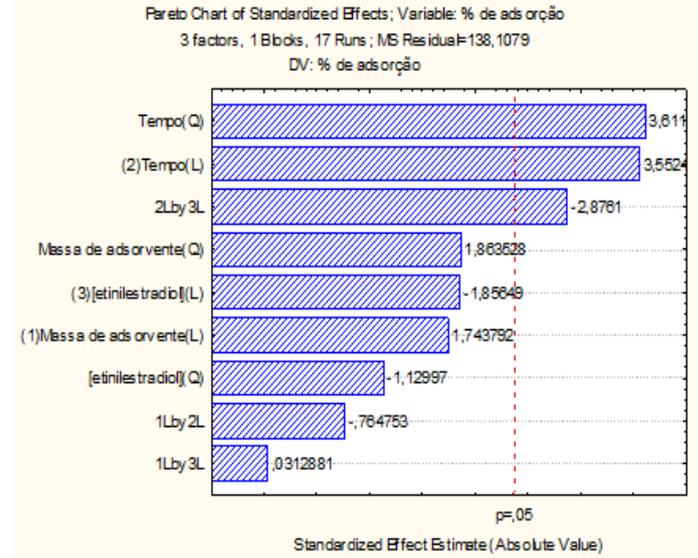


Figura 1: Gráfico de Pareto

#### 4. Conclusão

Os experimentos indicaram que o biocarvão pirolisado a 800°C e a biomassa in natura, mostraram-se promissores no processo de adsorção do 17 $\alpha$ -etinilestradiol. Portanto, a casca de côco verde pode ser utilizada como adsorvente, agregando um novo valor sustentável a este tipo de resíduo.

#### 5. Referências

BARROS NETO, Benicio de. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria/** Benicio de Barros Neto, Ieda SpacinoScarmínio, Roy Edward Bruns. -2ª ed.- Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2003.

GUIMARÃES, I S. **Oxidação de carvões ativados de endocarpo de coco da baía com soluções de hno3 e uma investigação sobre o método de Boehm.** Universidade Federal Da Paraíba, 2006.

MARIN, P *et al.* **Avaliação do efeito da temperatura, pH e granulometria do adsorvente na adsorção do corante azul reativo 5G.** Engevistav. 17, n. 1, p. 59–68 , 2015.

#### 6. Agradecimentos

Ao CNPQ/FAPEMIG (SICONV – 793988/2013)

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

## PRODUÇÃO DE SABONETE FACIAL GLICERINADO COM EFEITO DE *PEELING* ENZIMÁTICO

Leite<sup>1</sup>, B.; Ferreira<sup>1</sup>, L. Silva<sup>1</sup>, C. L. F.; Magalhães<sup>2</sup>, J. C. e Oliveira Júnior<sup>3</sup>, E.N.

<sup>1</sup>Universidade Federal de São João Del-Rei *Campus* Alto Paraopeba, Engenharia de Bioprocessos.

<sup>2</sup>Universidade Federal de São João Del-Rei *Campus* Alto Paraopeba, Laboratório de Microbiologia e Enzimologia, Departamento de Química Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos/Engenharia de Bioprocessos. <sup>3</sup>Universidade Federal de São João Del-Rei *Campus* Alto Paraopeba, Laboratório Biotecnológico, Departamento de Química Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos/Engenharia de Bioprocessos.

E-mail: eniobio@ufsj.edu.br

### 1. Introdução

As regenerações da pele a partir das camadas mais profundas têm sido observadas desde os primórdios. Nesse contexto, existem diversos tratamentos estéticos que favorecem a renovação de pele, melhorando a aparência do tecido cutâneo pela diminuição de manchas, acnes, marcas de expressão e outros. Em meio a diversos tratamentos estéticos, o processo de esfoliação (do inglês *Peeling*) se torna bastante eficaz na renovação celular e na reepitelização, o que permite maior permeação de princípios ativos (CAREGNATO *et al.*, 2011).

Os esfoliantes podem ser classificados em: químicos, físicos e enzimáticos. Nos métodos enzimáticos, são frequentemente adotadas enzimas proteolíticas de origem vegetal, como a papaína (do látex do mamoeiro), bromelina (do abacaxi) e enzimas também de outras fontes como romã e abóbora (SOUZA, 2004). Há diversas vantagens que justificam o uso desses esfoliantes frente aos químicos: biodegradabilidade, alta especificidade, baixa massa molecular (maior permeação na pele) e compatibilidade com diferentes tipos de peles (SANGEETHA; ABRAHAM, 2006).

A papaína pertence a um grupo de enzimas encontradas no látex do mamoeiro (*Carica papaya L.*), as quais são liberadas em decorrência de danos ao fruto verde. Esse látex possui aparência leitosa e é constituído por 40% de enzimas, sendo 8% de papaína. No látex, as

enzimas se encontram na forma inativa no interior da planta e concomitantemente a liberação, tornam-se ativas. Além disso, são caracterizadas pela capacidade hidrolítica na camada córnea da pele, segurança de absorção cutânea e auxílio na cicatrização de lesões na pele, favorecendo sua utilização em formulações cosméticas (KLASEN, 2000).

Dessa forma, esse trabalho objetivou a obtenção de um sabonete facial glicerinado com efeito *peeling* enzimático à base de látex bruto do mamoeiro. Nesta pesquisa optou-se por utilizar o extrato bruto, resultando também no acréscimo de vitaminas e aminoácidos ao produto final, reduzindo operações unitárias quanto aos processos de purificação.

### 2. Material e Métodos

#### 2.1 Obtenção do Látex

O látex do mamoeiro foi obtido do fruto de mamão verde sem retirada do fruto da planta por meio de cortes na casca. O látex foi armazenado em frasco estéril e sob refrigeração.

#### 2.2 Formulação do Sabonete de Glicerina

Para a formulação, 1 kg de base de glicerina foi derretido em banho de água e, em seguida, aguardou-se o decaimento da temperatura para 36°C para adição do extrato bruto de látex de

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

mamoeiro na concentração de 10% m/m. Essa solução foi transferida para formas e solidificada a temperatura ambiente durante 48 horas. Em seguida, os sabonetes foram pesados individualmente e embalados em filme de PVC.

### 2.3 *Teste do halo para Determinação da Viabilidade Enzimática*

O teste foi realizado com gelatina bacteriológica e colágeno 98%, sendo pesados 20% de ambos. Como o colágeno apresentava aparência fibrosa, foi necessária a sua filtração à vácuo após a mistura e dissolução em solução aquosa contendo metade de água quente seguida de adição de metade de água fria. Após a dissolução, ambos foram dispostos em placa Petri e armazenados em geladeira para solidificação durante 24 horas. Após, realizaram-se furos com auxílio de uma micropipeta de 1000  $\mu$ L, onde foram adicionados o controle (apenas tampão de citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M e pH 5), o extrato bruto do látex do mamoeiro em tampão e o sabonete diluído em tampão. Após 3 dias, foram analisadas alterações na gelatina e no colágeno.

### 2.4 *Teste de Durabilidade*

O sabonete foi mergulhado em 75mL de água durante 5 horas, e pesado antes e após o período de 5 horas, sendo retirada a matéria mole (SILVA, 2003).

### 2.5 *Teste da Rachadura*

O sabonete sólido foi mergulhado em banho de água durante 10 minutos. Em seguida, foi removido da água e analisaram-se os tipos de rachaduras formadas na superfície por 7 dias (SILVA, 2003).

### 2.6 *Altura da Espuma*

Foram transferidos 2g de sabonete para uma proveta de 100mL e adicionaram-se 18mL de

água. Em seguida, a proveta foi agitada vigorosamente para formação de espuma. A solução ficou em repouso por 10 minutos e, em seguida, verificou-se o volume de espuma obtida na proveta (SILVA, 2003).

### 2.7 *Função antimicrobiana*

Esse teste verificou a redução de microrganismos totais pela comparação de um sabonete composto ou não por papaína. Para isso, se realizou o preparo do meio de cultura ágar batata e ágar Luria Bertani. Em seguida, as mãos foram lavadas vigorosamente com cada sabonete, utilizadas para inoculação microbiana na superfície do meio. As placas foram incubadas a 32°C por 3 dias quando foi avaliado o crescimento microbiano.

## 3. *Resultados e Discussão*

Durante a obtenção do extrato bruto de látex, observou-se a formação de coágulos no fruto que indica um processo de proteção e cicatrização da planta, resultando também na ativação de enzimas proteolíticas (DÉRY et al., 1998).

Os sabonetes produzidos apresentaram coloração clara e característica do aditivo adicionado, muito brilho, homogeneidade, odor característico, textura macia e peso médio de 39g, conforme Figura 1.

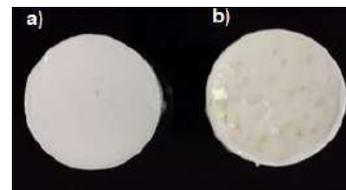


Figura 1 – Aspecto do sabonete: a) sem papaína e b) com papaína.

O extrato bruto do látex foi adicionado na proporção de 10%, considerando que Piper e coautores (2003), consideram que a papaína nessa proporção apresenta efeitos positivos no processo de cicatrização de ferimentos, atuando no desbridamento bioquímico e enzimático de

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

feridas agudas ou crônicas. Cohen e colaboradores (1992) discutem que as enzimas proteolíticas contidas no látex são capazes de desenvolver processos metabólicos e desencadear reações como: ativação de plaquetas com liberação de fatores de crescimento e citocinas, processo inflamatório, granulação e reepitelização.

Pelo teste do halo, foi possível verificar que não há perda de viabilidade das enzimas proteolíticas, sendo confirmada pela degradação parcial ao redor do halo, causando solubilização tanto da gelatina microbiana quanto do colágeno (Figura 2).

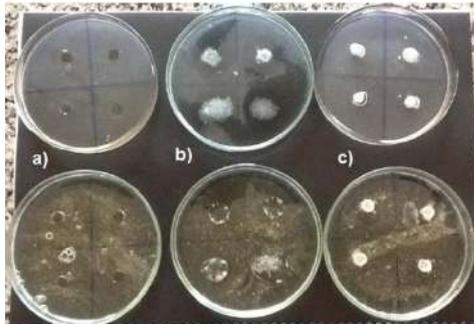


Figura 2 – Teste de viabilidade enzimática após três dias de incubação, sendo na parte superior o teste em colágeno e na parte inferior em gelatina bacteriológica: a) Controle (tampão), b) Extrato bruto diluído em tampão e c) Sabonete diluído em tampão.

Houve maior degradação do colágeno em comparação com a gelatina microbiana devido à maior concentração de proteínas nesse substrato. Além disso, observa-se que a degradação gerada pelo sabonete se deu em menor proporção do que em comparação com o látex em função também da concentração de enzimas atuantes. Contudo, foi possível averiguar que as enzimas se mantiveram viáveis no sabonete após o processo de produção por um longo período.

A degradação menos evidente pode explicada em razão da baixa proporção de enzimas no sabonete, sendo também um indicativo que é possível que, nessa proporção, a atuação sobre a pele seja praticamente imperceptível, principalmente por não haver tempo de retenção, como ocorre em hidratantes

corporais e produtos não lavados após o uso. Portanto, é possível um aumento da concentração do látex promova efeitos mais perceptíveis.

Em relação às propriedades físicas e químicas do sabonete, os resultados obtidos foram dispostos na Tabela 1.

Tabela 1: Ensaios físicos e químicos realizados e seus resultados

Ensaios	Resultado
pH	9,35
Durabilidade	1,77 g (massa perdida)
Rachadura	Não houve
Espuma	18 cm

O valor de pH obtido é alcalino e está em uma faixa adequada para sabonetes comerciais em barra (FEITOSA *et al.*, 2015).

O teste de durabilidade está relacionado com o amolecimento (formação de material gelatinoso) do sabonete, por absorver umidade quando deixado em contato contínuo com a água após seu uso (BARBIZAN, 2013). Neste ensaio, verificou-se que os sabonetes apresentaram uma boa durabilidade, pois houve perda de menos de 20%, o que está de acordo com a literatura (MEIRA, 2010).

Com relação ao teste de rachadura (Figura 4), que demonstra a resistência dos sabonetes quando expostos à luz e à umidade, verificou-se que não apresentaram nenhum tipo de rachadura na face e no verso, mostrando resistência do produto ao ressecamento por exposição ao ambiente.



Figura 4 – Teste da rachadura: a) 01 dia e b) 06 dias de imersão em água

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

Quando ao índice de espuma, a formulação apresentou aspecto denso, sem formação de bolhas grandes. A altura de espuma obtida se enquadrava dentro da literatura que afirma que a média é entre 18 a 19cm (DIEZ; CARVALHO, 2000).

Os sabonetes contendo látex também apresentaram ação antimicrobiana uma vez que houve uma redução da densidade de microrganismos. Esse sabonete ainda apresentou resultados melhores do que o sabonete sem látex. Isso provavelmente pode ter ocorrido em função das proteínas contidas na estrutura de bactérias e fungos e também pela degradação de enzimas extracelulares produzidas por microrganismos, reduzindo o processo de degradação do substrato e fonte energética.

#### 4. Considerações Finais

Conclui-se que as enzimas proteolíticas do látex do mamoeiro se mantêm ativas após a produção do sabonete. A formação pequena do halo não pode ser explicada apenas com os dados obtidos nesse experimento. Isso pode ter ocorrido em razão da baixa concentração contida no sabonete ou ainda a perda da viabilidade parcial. Para a confirmação, é necessária a realização de testes quantitativos. Assim, em termos gerais, percebe-se que é possível fabricar um sabonete com efeito de *peeling* enzimático baseado no látex bruto do mamão verde dentro dos padrões comerciais.

#### 5. Referências Bibliográfica

BARBIZAN, F.; FERREIRA, E.C; DIAS, I.L.T. Sabonete em barra produzido com Óleo de oliva (*Olea europea L.*) como proposta para o desenvolvimento de cosméticos verdes. **Rev. Biol. Farm.**, n. 9, v.1, p. 1-6, 2013.  
CAREGNATO, B.D.; GARCIA, G. A.; FRANÇA, A.J. **Estudo comparativo entre esfoliante químico e enzimático no processo de esfoliação facial.** 2011. 33 f. Dissertação (Graduação em Tecnologia em Cosmetologia e

estética) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2011.

COHEN, I.K.; DIEGELMANN, F.R.; LINDBLAND, W.J. **Wound healing: biochemical and clinical aspects.** 1.ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1992. 630p.

DÉRY, O.; CORVERA, C.U.; STEINHOFF, M.; BUNNETT, N.W. **Proteinase activated**, 558p. cap.11, p.221-264.

DIEZ, M. A; CARVALHO, G.S.C. **Aditivos para sabonetes em barra.** Oxiteno S/A Indústria e Comércio. São Paulo – SP, 2000.

FEITOSA et al. **Determinação da alcalinidade e pH de sabonetes comerciais em barra para controle de qualidade.** Disponível em: <<http://www.abq.org.br/entequi/2015/trabalhos/50/50-8045-21307.html>> Acesso em 19 maio 2019.

KLASEN, H.J. **A review on the nonoperative removal of necrotic tissue from burn wounds.** **Burns**, v.26, p.207-222, 2000.

MEIRA, M. **Avaliação comparativa das normas regulatórias dos estudos de estabilidade aplicados a sabonetes sólidos no Brasil, EUA e União Europeia.** 60 f. Dissertação (Bacharel em Farmácia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

SANGEETHA, K.; ABRANHAM, T.E. **Chemical modification of papain for use in alkaline medium.** **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.** v.38, p.171-177, 2006.

SILVA, C. R. S. **Biomiméticos com ativos da Amazônia.** **Cosmetics & Toiletries**, v. 15, n.5, p.66-71, 2003.

SOUZA, V.M. **Ativos Dermatológicos: Guia de ativos dermatológicos utilizados na farmácia de manipulação para médicos farmacêuticos.** 2 ed. São Paulo: Tecnopress, 2004.

CALIRI, M.H.L; MIYAZAKI, M.Y; PIPER, B. **Knowledge about pressure ulcers by undergraduate nursing students in Brazil.** **Ostomy Wound Manage**, v. 49, n.3, p:54-63, 2003.

## OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ÁCIDA DA CASCA DE CAFÉ VISANDO A OBTENÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS

Santos<sup>1</sup>, A. F. C.; Durso<sup>2</sup>, T. F. A.; Sarrouh<sup>2</sup>, B.

<sup>1</sup>Universidade Federal de São João Del-Rei/ Curso de Engenharia Química - Departamento de Engenharia Química

<sup>2</sup>Universidade Federal de São João Del-Rei/ Programa de Pós-Graduação em Tecnologias para o Desenvolvimento Sustentável

E-mail: [thamires.durso@gmail.com](mailto:thamires.durso@gmail.com)

### 1. Introdução

Os resíduos agroindustriais são fontes renováveis e abundantes de compostos orgânicos que apresentam grande potencial de uso como matérias-primas em processos industriais para a produção moléculas de valor agregado, insumos químicos e energia (Empresa de Pesquisa Energética, 2015; Rosa *et al.*, 2011).

Dentre os diversos resíduos agroindustriais produzidos no território brasileiro, a casca de café se destaca. Segundo o CONAB, em 2018 foram 61,7 milhões de sacas beneficiadas, o que mantém o país no destaque como maior produtor de café do mundo.

Porém, os subprodutos do processamento do café, principalmente a casca de café, não possuem utilização definida. Uma das limitações para o aproveitamento integral de todas as frações dos resíduos lignocelulósicos é a própria estrutura da biomassa. Geralmente, é necessária a ruptura do complexo lignina-celulose-hemicelulose por técnicas de pré-tratamento, uma vez que a associação dessas frações confere grande resistência ao ataque de agentes químicos, enzimáticos ou microbianos (Saha *et al.*, 2005). Diversos métodos têm sido empregados para a hidrólise dos componentes dos materiais lignocelulósicos (Sun; Cheng,

2002; Kumar *et al.*, 2009), tornando-os úteis para uso em bioprocessos, por meio da liberação de seus correspondentes açúcares fermentáveis. Como exemplo destes métodos, destaca-se o pré-tratamento com ácido diluído.

O pré-tratamento com ácido diluído se caracteriza como eficiente técnica para conversão da hemicelulose (cerca de 90%) (Corrêa, 2016). Dentre os açúcares redutores oriundos da hidrólise desse polímero, têm-se a xilose que vem recebendo notória atenção em processos de produção de etanol e adoçantes (Schlittler, 2006). Sendo assim, no presente trabalho a casca de café foi utilizada como matéria-prima renovável em um processo de hidrólise ácida da fração hemicelulósica, visando à obtenção de licor rico em açúcares fermentescíveis.

### 2. Material e Métodos

Após recebimento e limpeza, a casca de café "*in natura*" passou por uma etapa de trituração e secagem na estufa a 100 °C para obtenção de peso constante. Adicionou-se 5,5 g de casca em base úmida, seguida de água e de ácido sulfúrico 97%, respectivamente. Os experimentos foram realizados em duplicatas.

A relação entre casca/solução de ácido sulfúrico foi fixada em 1:10 em todos os todos

os testes realizados. No processo de otimização da hidrólise, buscou-se definir as condições que maximizavam a obtenção de açúcares através de um planejamento experimental fatorial  $2^3$  com 3 pontos centrais. Para as diferentes condições do planejamento experimental (Tabela 1).

Tabela 1 - Codificação dos níveis das variáveis avaliadas para a hidrólise ácida da casca de café.

Variáveis	Níveis		
	(-)	0	(+)
$X_1$ ( $H_2SO_4$ , %v/v)	1,0	3,0	5,0
$X_2$ (temperatura, °C)	80	100	120
$X_3$ (tempo, min)	10	20	30

Para a determinação de açúcares totais redutores utilizou-se o método de Ácido

Tabela 2 - Condições experimentais e resultados obtidos no primeiro planejamento fatorial  $2^3$  completo para quantificação de açúcares redutores na hidrólise enzimática.

Experimento	Conc. $H_2SO_4$ (%V/V)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	*Conc. de Açúcares (g/L)
1	5,0	120	30	23,85
2	5,0	120	10	26,69
3	5,0	80	30	18,69
4	5,0	80	10	16,65
5	1,0	120	30	19,56
6	1,0	120	10	18,93
7	1,0	80	30	12,04
8	1,0	80	10	9,90
9	3,0	100	20	18,65

A variável que teve a maior influência nos valores da concentração de açúcares no processo de hidrólise ácida foi a temperatura que apresentou um valor  $p=0,0001$ , seguida pela concentração de  $H_2SO_4$  com  $p=0,0002$  e a

Dinitro-3,5 Salicilico (DNS) (Maldonado, Carvalho e Ferreira, 2013).

Após a realização do delineamento experimental, os dados foram submetidos à análise de variância ao nível de 90% de confiança.

### 3. Resultados e Discussão

A Tabela 2 contém os valores das concentrações de açúcares obtidos na quantificação pela metodologia do DNS após a realização da hidrólise enzimática de acordo com o planejamento fatorial  $2^3$  completo.

Utilizou-se as variáveis envolvidas no planejamento fatorial e a média aritmética do rendimento de açúcares em cada ensaio para a realização das análises estatísticas.

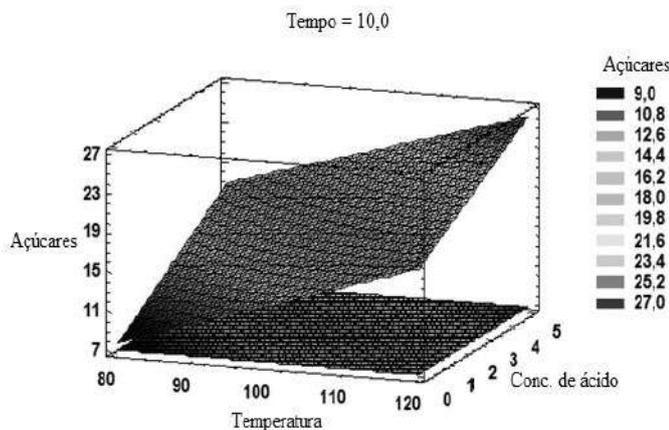
interação entre a temperatura e o tempo da reação ( $p=0,0258$ ) (Tabela 3). Por outro lado, a variável do tempo de hidrólise se correspondeu como a menos significativa, uma vez que apresentou valor de  $p>0,05$ .

Tabela 3 – Análise de variância (ANOVA) para ajuste do modelo de dados do planejamento fatorial.

Variáveis	Soma dos Quadrados	Média quadrática	Nível de significância (p)
<b>A: Temperatura (°C)</b>	126,008	126,008	0,0001
<b>B: Conc. de ácido (% v/v)</b>	80,9628	80,9628	0,0002
<b>C: Tempo (min)</b>	0,485112	0,485112	0,3461
<b>AB</b>	0,227812	0,227812	0,5052
<b>AC</b>	5,10401	5,10401	0,0258
<b>BC</b>	1,59311	1,59311	0,1253

A influência dessas variáveis também pode ser observada no Gráfico de Pareto (Figura 1). Através da superfície de resposta, pode-se observar os efeitos variáveis da temperatura de reação.

Figura 1 - Superfície de resposta obtida para a concentração de açúcares totais em função da concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, temperatura de reação e tempo de reação de 10 min.



As menores concentrações de açúcares totais são obtidas no limite inferior de temperatura, ou seja, a 80°C, enquanto no limite superior (120°C), obteve-se uma concentração máxima. Da mesma forma, observou-se que, uma máxima concentração de açúcares foi observada a uma concentração de 5% v/v de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em 10 min de reação (Figura 1). Baseando-se na metodologia de superfície de resposta, as condições ótimas

para a produção de açúcares fermentescíveis a partir da casca de café são: temperatura de 120 °C, concentração de ácido de 5% (%v/v) e tempo de reação de 10 min, alcançando uma concentração máxima de aproximadamente 27 g/L de açúcares totais.

Considerando que, teoricamente a fração hemicelulósica constitui 30% da casca de café (30 g/L de açúcares redutores teóricos). Observou-se que a eficiência da hidrólise ácida nas condições otimizadas foi de 90% na liberação de açúcares redutores. A eficácia desse pré-tratamento utilizando-se ácido sulfúrico também foi comprovada no trabalho de Roviero (2017). Ao realizar a hidrólise ácida da biomassa derivada da cana-de-açúcar, o autor reduziu 90% do teor de hemicelulose no resíduo.

Na otimização da hidrólise ácida, segundo o coeficiente de correlação múltipla, 99 % da variância da recuperação de açúcares pode ser explicada pelas variáveis do planejamento experimental adotado (temperatura, concentração de ácido e tempo) e pelas suas interações.

O ajuste do R<sup>2</sup> foi satisfatório, se adequando a 98% dos dados. O modelo matemático empírico ajustado pela regressão linear, que melhor representou a concentração dos açúcares totais obtidos na faixa de trabalho avaliada, em função das variáveis independentes, está descrito na Equação 1:

$$\text{Conc. Açúcares totais (g/L)} = -17,3127 + 0,29*A + 2,46*B + 0,49*C - 0,004*AB - 0,004*AC - 0,022*BC \quad (1)$$

Sendo A = temperatura (°C), B = Conc. Ácido (%v/v) e C = Tempo de reação (min).

Dessa forma, a análise estatística demonstrou que a temperatura é a variável de maior influência na recuperação, seguida pela concentração de ácido sulfúrico.

#### 4. Conclusão

A hidrólise ácida diluída da fração hemicelulósica da casca de café se mostrou altamente eficiente na recuperação de açúcares fermentescíveis. Segundo o teste de superfície de resposta verificou-se que, as condições otimizadas foram, temperatura de 120 °C, concentração de ácido sulfúrico de 5% (v/v) e tempo de reação de 10 min. Sob essas condições ótimas, a recuperação máxima de açúcares redutores foi de 26,69 g/L.

#### 5. Referências bibliográficas

Companhia nacional de Abastecimento - **Conab. Acompanhamento da Safra Brasileira Café**. Quarto levantamento – Dez. 2018. Brasília, 2018.

Corrêa, L. J. **Estudos de melhorias no processo de hidrólise enzimática de biomassas para produção de etanol**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos, 2016.

Empresa de Pesquisa Energética. **Balanco Energético Nacional 2015**. Rio de Janeiro: EPE, 2015. 62 p.

Kumar, P.; Barrett, D. M.; Delwiche, M. J.; Stroeve, P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Industrial Engineering Chemical Resource**, v.48,p. 3713–3729, 2009.

Maldonade, I.R; Carvalho P.G.B.. Ferreira, N.A. Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS. **Comunicado Técnico 85, ISSN 1414.9850**, Março, 2013.

Rosa, M. F. et al. Valorização de resíduos da agroindústria. **In: Simpósio internacional sobre gerenciamento de resíduos agropecuários e agroindustriais**, 2., 2011, Foz do Iguaçu. Palestras... Concórdia, SC: Sbera, 2011.

Roviero, J. P. **Biomassa derivada da cana-de-açúcar e cana energia submetidas à hidrólise ácida e enzimática para a produção de etanol**. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária). Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, São Paulo. 2017.

Saha, B. C.; Iten, L. B.; Cotta, M. A.; Wu, V. Y. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochemistry**, v.40, p. 3693–3700, 2005.

Schlittler, L.A.F.S. **Engenharia de um Bioprocesso para Produção de Etanol de Bagaço de Cana-de-Açúcar**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2006.

Sun, Y. & Cheng, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 39/40, p. 587-600, 2002.

#### 6. Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Federal de São João del-Rei, à FAPEMIG e ao CNPq.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

## Bioprospecção de actinobactérias produtoras de enzimas de interesse da biotecnologia agroindustrial

Gomes<sup>1</sup>, M. R.; Melo<sup>1</sup>, I. G.; Leal<sup>2</sup>, V. S. e Marriel<sup>1,2,3</sup>, I. E.

<sup>1</sup> Universidade Federal de São João del-Rei/Engenharia agrônoma

<sup>2</sup> Centro Universitário de Sete Lagoas/Ciências Biológicas

<sup>3</sup> Embrapa Milho e Sorgo/Microbiologia e Bioquímica do Solo

E-mail: mariarita\_agro@outlook.com

### 1. Introdução

A bioprospecção e uso de genomas, genes ou produtos de origem microbiana tornou-se estratégia indispensável como base futura dos desenvolvimentos agrícolas, ambientais e industriais sustentáveis. O termo bioprospecção tem sido utilizado para descrição da busca sistemática e organizada de produtos úteis derivados de recursos biológicos, incluindo plantas, microrganismos, animais, etc., promovendo e regulamentando novas tecnologias para comercialização (PUSHPANGADAN *et al.*, 2017).

No caso de microrganismos, a bioprospecção abrange principalmente estratégias para exploração e conhecimento da biodiversidade microbiana, bem como seus papéis funcionais no ambiente, tornando-se um dos principais focos da era biotecnológica para soluções sustentáveis em setores agroindustriais diversos de interesse global (SINGH *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2015).

Dentre os microrganismos presentes no solo, encontram-se as actinobactérias que são bactérias filamentosas Gram-positivas com alta concentração de guanina e citosina no DNA (BARKA *et al.*, 2016). Estas bactérias desempenham um papel importante na reciclagem de resíduos orgânicos e nutrientes no meio ambiente, mas tem sido explorado com sucesso principalmente como fonte de milhares de produtos metabólicos secundários biologicamente ativos de interesse biotecnológico na agroindústria. Dentre esses

metabólitos incluem-se notadamente glicopeptídeos, beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, políenos, policetídeos, macrolídeos, actinomicinas, tetraciclina, enzimas e produtos antimicrobianos (BARKA *et al.*, 2016).

As actinobactérias produzem diferentes enzimas de importância agroindustrial, com destaque para celulases, amilases, pectinases e proteases, cujos substratos são constituintes de microrganismos como fungos fitopatogênicos, insetos e/ou de plantas. Consequentemente, são biocatalizadores relevantes com vasta aplicabilidade em setores agrícolas, industriais, alimentícios, têxteis, papéis, biocombustíveis, tratamento de resíduos orgânicos, etc. (ORLANDELLI, 2012; SILVA, 2015; GOMAA, 2013). Em processos agropecuários, vale salientar o emprego de tais ferramentas biotecnológicas em processos de compostagem, produção de biocombustíveis e de controle biológico de microrganismos causadores de doenças em culturas de importância econômica relevante.

### 2. Material e métodos

#### 2.1 Ativação das culturas e índice enzimático

Foram testados 77 isolados de actinobactérias preservados na Coleção de Microrganismo da Embrapa Milho e Sorgo. Estes microrganismos foram crescidos em meio de cultura seletivo para actinobactérias através

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

da técnica de esgotamento. Em seguida, as placas foram incubadas a 30°C durante dez dias e, após este período, células foram suspensas em solução salina e utilizadas para determinações enzimáticas.

### 2.2 Avaliação da atividade enzimática

Os microrganismos foram crescidos em meio de cultura específico para cada enzima avaliada.

A atividade amilolítica foi estimada conforme metodologia descrita por Coon *et al.* (1957). As actinobactérias foram inoculadas no meio de cultura ágar amido e incubadas a 30°C por sete dias. Após este período, as placas foram tratadas para revelação da presença de halo opaco ao redor das colônias e estimativa do índice enzimático.

Para a atividade celulolítica utilizou-se a metodologia preconizada por Teather & Wood (1982), sendo os microrganismos cultivados em meio de cultura mínimo M9 durante 48 horas a 30°C contendo a celulose como única fonte de carbono.

No caso da atividade pectinolítica, foram cultivados de modo similar, utilizando a pectina cítrica como fonte de carbono. As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas, tratadas para detecção e medida do halo.

A atividade proteolítica foi estimada através do crescimento dos isolados em meio YMA modificado (Yeast Malt Agar), durante quatro dias, para medida do diâmetro do halo, quando presente.

A atividade hidrolítica das enzimas amilase, celulase, pectinase e proteases foi expressa através do índice enzimático (IE), estimado pela equação:

$$IE = (DH + DC) / DC, \quad (1)$$

sendo DH equivalente ao diâmetro em mm do halo e DC ao diâmetro em mm das colônias dos isolados (LEALEM & GASHE, 1994). O diâmetro do halo reflete a habilidade degradativa dos substratos pelas enzimas (LEALEM & GASHE, 1994).

### 3. Resultados e discussão

Independentemente das enzimas estudadas, os dados obtidos mostraram diferenças no comportamento observado entre isolados e permitiram a classificação destes microrganismos em dois grupos quanto ao potencial de degradação de seus respectivos substratos, com base em índice enzimático (IE) maior ou menor que 2, conforme proposto por Lealem & Gashe (1994). Os resultados obtidos para os diferentes isolados de actinobactérias em relação à atividade das enzimas celulase, pectinase, protease e amilase estão apresentados nas figuras de 1 a 4, respectivamente.

No caso da celulase (Fig. 1), detectou-se que, entre os isolados testados, 68,8% apresentaram  $IE \geq 2$ , enquanto somente 31,18% mostraram baixa atividade ( $IE < 2$ ). De modo similar, para as enzimas pectinase e amilase (Fig. 2 e 4), observou-se que maioria dos isolados apresentou índice enzimático acima de 2, com valores de 72,7 e 68,8%, respectivamente. Os demais isolados demonstraram baixa atividade destas enzimas. Em contraste, para a protease, baixa atividade foi apresentada pela maioria dos isolados (70,1%).

### Atividade Celulolítica

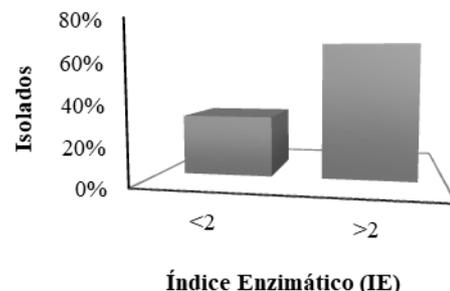


Figura 1 - Distribuição dos isolados (%) de actinobactérias com base no índice enzimático para a atividade da enzima celulase.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

## Atividade Pectinolítica

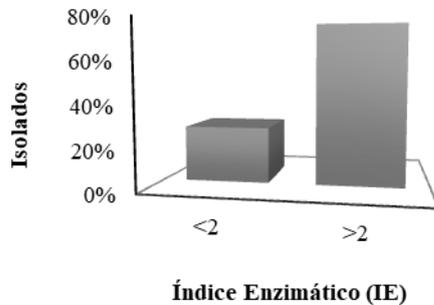


Figura 2 - Distribuição dos isolados (%) de actinobactérias com base no índice enzimático para a atividade da enzima pectinase.

## Atividade Proteolítica

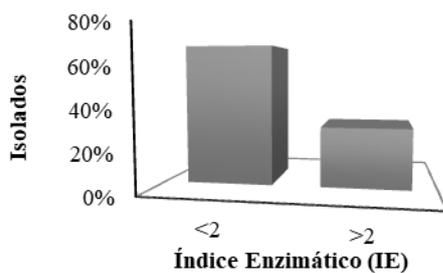


Figura 3 - Distribuição dos isolados (%) de actinobactérias com base no índice enzimático para a atividade da enzima protease.

## Atividade Amilolítica

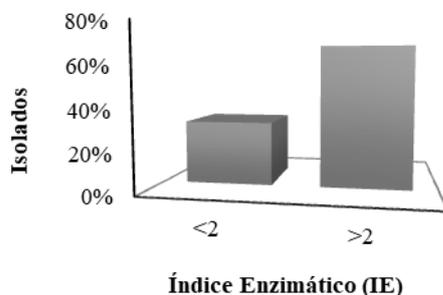


Figura 4 - Distribuição dos isolados (%) de actinobactérias com base no índice enzimático para a atividade da enzima amilase.

podem ser consideradas eficientes para produção de enzimas e degradação dos seus substratos. Com base nestes resultados, tornou-se possível a identificação de isolados promissores como recursos microbianos em processos biotecnológicos, considerando-se as enzimas celulase (A92 e A405), pectinases (ACT 648 e AEJ 57), protease (ACT 83 e o AEJ 57) e amilase (AM 45 e o AC 91).

Na literatura está bem documentada a capacidade de microrganismos em degradar macromoléculas, biomassa vegetal, lignina, celulose, pectina e outros polissacarídeos complexos, bem como a diversidade e potencial biotecnológico de actinobactérias como produtores de enzimas extracelulares (Salwan & Sharma, 2018).

As actinobactérias são também conhecidas como biofábricas de enzimas, com aplicações em indústrias têxteis, bio-refinarias, alimentos, papel e celulose, agricultura, detergentes e farmacêuticas (Salwan & Sharma, 2018).

## 4. Conclusão

Os resultados demonstraram variabilidade entre os isolados testados e permitiram a seleção de isolados de actinobactérias com potencial de uso agroindustrial das diferentes enzimas. Foram selecionados isolados como produtores de celulase (A92 e A405), pectinase (ACT 648 e AEJ 57), protease (ACT 83 e o AEJ 57) e amilase (AM 45 e o AC 91).

De acordo com Lealem & Gashe 1994), actinobactérias que apresentam IE >2 e IE <2

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

### 5. Referências

- BARKA, E. A.; VATSA, P.; SANCHEZ, L.; GAVEAU-VAILLANT, N.; JACQUARD, C.; KLENK, H. P.; CLÉMENT, C.; OUHDOUCH, Y.; VAN WEZELD G. P. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* v. 80, n. 1. March, 2016.
- COON, H. J.; JENNISON, M. W.; WEEK, O. B. Routine tests for the identification of bacteria. In: *Manual of Microbiological Methods* (ed. Society of American Bacteriologists). New York: McGraw-Hal, 1957. p. 239-262.
- GOMAA, E. Z. Some applications of  $\alpha$ -amylase produced by *Bacillus subtilis* NCTC10400 and *Bacillus cereus* ATCC 14579 under solid state fermentation. *African Journal of Microbiology Research*, v. 7, n. 29, p. 3720–3729, 2013.
- LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a Gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eragrostis tef*). *Journal of Applied Bacteriology*, v. 77, p. 348-352, 1994.
- ORLANDELLI, R. C., SPECIAN, V., FELBER, A. C., PAMPHILE, J. A.; Enzimas de interesse industrial: Produção por fungos e aplicações. *Rev. Saúde e Biol.*, v.07., n.3, p.97-109, set-dez., 2012.
- PUSHPANGADAN, P.; GEORGE, V.; IJINU, T. P., CHITHRA, M. A. Biodiversity, Bioprospecting, Traditional Knowledge, Sustainable Development and Value Added Products: A Review. 2017.
- SALWAN, R.; SHARMA, V. The Role of Actinobacteria in the Production of Industrial Enzymes. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, 2018, p. 165-177.
- SINGH, J.; SHARMA, D.; KUMAR, G.; SHARMA, N. R. *Microbial Bioprospecting for Sustainable Development*. Springer p. 397, 2018.
- SILVA, L. C. B. Identificação de actinobactérias e *Thermoactinomyces* spp. isolados do processo de compostagem para a produção de *Agaricus brasiliensis*. 2010. 89 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- SILVA, V. M. A.; BRITO, F. A. E.; RAMOS, K. A.; SILVA, R. M.; MARTINS, C. M.; MAR-TINS, S. C. S. Atividade Enzimática de Actinobactérias do Semiárido. *Revista Brasileira de Geografia Física*, v. 8, p. 560-572, 2015.
- TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, v.43, p. 777-780, 1982.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

## POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE ISOLADOS BACTERIANOS OBTIDOS A PARTIR DA EPIDERME DE ANUROS DO QUADRILÁTERO FERRÍFERO

Fernandes, C. H. P.<sup>1</sup>; Cordeiro, I. F.<sup>1</sup>; Sanchez, A.B.<sup>1</sup>; Matos, R. C.<sup>1</sup>; Moreira, L. M.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genômica e Interação Bactérias-Ambiente, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil. E-mail

E-mail: [camilahenriquesp@gmail.com](mailto:camilahenriquesp@gmail.com)

### 1. Introdução

A Estação Ecológica do Tripuí (EET) está localizada no Quadrilátero Ferrífero, Ouro Preto, MG. A EET encontra-se em uma região de transição entre dois biomas, a Mata Atlântica e o Cerrado e, portanto, destaca-se por sua elevada biodiversidade, com destaque para a anurofauna (MYERS et al., 2000). A pele dos anuros exerce funções importantes, tais como proteção, respiração, osmorregulação e termorregulação e, por ser altamente permeável, sofre intensamente com a presença de contaminantes ambientais. (DUELLMAN & TRUEB, 1986)

Bactérias com potenciais benéficos vêm se destacando no controle biológico de patógenos que afetam a produtividade de diversas culturas agrícolas. As bactérias podem desempenhar papéis de antagonismo de diferentes formas, como antagonismo direto, antibiose, competição por nutrientes, competição por nichos ecológicos, produção de sideróforos, predação e parasitismo, produção de enzimas, produção de compostos voláteis inibitórios, interferência com fenômenos de *quorum sensing*, indução a resistência, ou através mais de um mecanismo (GERHARDSON, 2002; ROMEIRO; GARCIA, 2009).

As bactérias possuem capacidade de perceber a presença de outros organismos ao

seu entorno, bem como alterações no meio em que estão inseridas, sendo essa característica primordial para sua sobrevivência. Para que as mesmas se estabeleçam em um ambiente, é necessário que seus genes sejam expressos em resposta a sinais de possíveis ameaças do ambiente e a microbiota presente (ROMEIRO, 2007).

Recentemente, nossa equipe demonstrou que a microbiota associada a diferentes espécies de anuros desta região apresentam elevada tolerância a metais pesados (CORDEIRO et al., 2019). Agora, esta mesma microbiota cultivável está sendo investigada quanto a seu potencial antifúngico. Para isso, 162 isolados bacterianos obtidos a partir da pele das espécies *Boana albopunctata*, *Boana faber*, *Rhinella crucifer* e *Ischnocnema izecksohni* foram investigadas como potenciais controladores biológicos de *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum lindemuthianum*, agentes causais da fusariose e da antracnose respectivamente, e que acometem diversas culturas agrícolas de interesse comercial, acarretando prejuízos severos.

### 2. Material e métodos

A coleta da microbiota cutânea dos anuros foi realizada com o auxílio de um SWAB (cotonete) estéril e cultivada em meio Luria-Bertani (LB) (CORDEIRO et al., 2019). Para cada SWAB impregnado, foram realizadas

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

diluições em até  $10^{-8}$ . As diluições foram aplicadas em placas de Petri de 90x15 mm, em quantidades de 100  $\mu$ l, contendo meio LB sólido, e incubadas a 28°C por quatro dias. Para o isolamento das bactérias, foi realizada a técnica de esgotamento, o que permitiu a obtenção de colônias isoladas. Desta forma, foram obtidos 162 isolados bacterianos (CORDEIRO et. al., 2019).

Para caracterização inicial de ação antagonista, os 162 isolados foram avaliados contra o *F. oxysporum*, por meio de ensaio de inibição direta. Para isso, as bactérias com densidade óptica ( $OD_{600nm}$ ) padronizada em 0,1, foram semeadas na forma de um quadrado de aresta de 3 cm, no centro de placas de Petri de 90x15 mm, contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA). Posteriormente, um disco micelial de 6 mm de diâmetro, de uma cultura de fungo em meio BDA, foi inserido na porção central do quadrado e incubado a 28°C, até que o crescimento do fungo na placa controle (sem bactéria) atingisse 30 mm de diâmetro.

Após este período, a taxa de inibição foi calculada medindo-se o diâmetro de crescimento do fungo, seguido da exclusão da medida de 6 mm referente ao disco micelial previamente inoculado. Em seguida, foi calculado o desvio padrão, levando em consideração a média de cada amostra, realizada em triplicata (em relação ao experimento controle) e o valor obtido foi multiplicado por 100, obtendo assim o resultado em porcentagem. Os isolados que apresentaram um melhor desempenho foram avaliados contra o *C. lindemuthianum*, nos mesmos modelos metodológicos estabelecidos para *F. oxysporum*. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

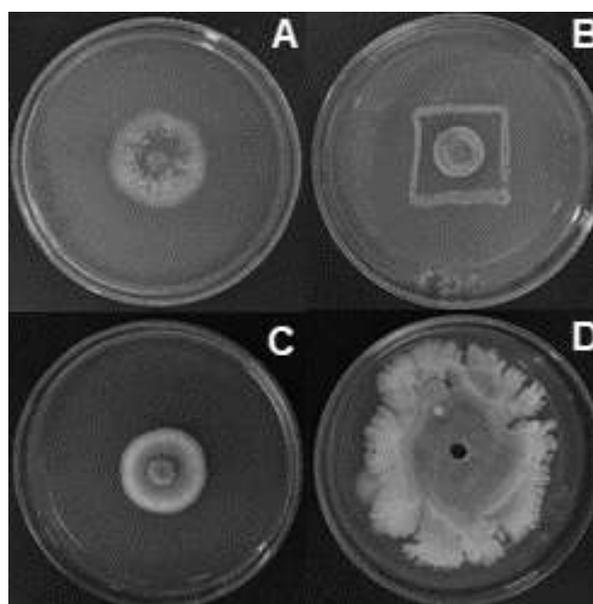
### 3. Resultados e discussão

Do total de isolados analisados, dois foram capazes de inibir até 60% do crescimento de *F. oxysporum* e outros dois apresentaram inibição de 100% para o *C. lindemuthianum*.

No presente estudo, os isolados bacterianos não foram identificados quanto a sua

taxonomia. Magalhães (2013) demonstrou resultados semelhantes em seu estudo de antagonismo contra fungos de interesse agrícola através das espécies *Burkholderia plantarii*, *Burkholderia glumae*, *Burkholderia gladioli* e *Bacillus subtilis*.

Os resultados obtidos podem ser observados na figura 1. Estes resultados corroboram com os encontrados por Tenorio-Salga et al. (2013), uma vez que, ao testarem isolados bacterianos contra fungos, foram obtidos resultados semelhantes de antagonismo.



**Figura 1.** (A) Placa controle contendo apenas o fungo *F. oxysporum*, sem bactéria controladora; (B) *F. oxysporum* com isolado bacteriano; (C) Placa controle contendo apenas o fungo *C. lindemuthianum*, sem bactéria controladora; (D) *C. lindemuthianum* com isolado bacteriano.

Estudos mostram que alguns fatores importantes para a supressão de fitopatógenos podem estar relacionados a metabólitos como antibióticos, enzimas e compostos voláteis produzidos por bactérias (HAAS; DEFAGO, 2005; FERNANDO et. al., 2005; LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009; LI et. al., 2012; AL-MUGHRABI et. al., 2013). As bactérias desenvolvem mecanismos para

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

afastar outros organismos e conseguir proliferar e se desenvolver. Elas podem produzir substâncias com diferentes níveis de atividade antifúngica específica ou de amplo espectro (RAAIJMAKERS; MAZZOLA, 2012).

Nesse cenário, os metabólitos microbianos produzidos pelas bactérias possuem um papel primordial para adaptação das mesmas, permitindo-as de responder aos outros microrganismos presentes e alterações do meio em que estão inseridos. (BERLEMAN; KIRBY, 2009). Além disso, metabólitos biológicos são muito menos danosos ao meio ambiente, contrapondo o uso de compostos químicos, os quais são os mais utilizados para o tratamento da fusariose e actranose.

Em paralelo a este cenário de importância da descoberta de novas biomoléculas de interesse biotecnológico, nas últimas décadas, uma média de 43% das espécies de anfíbios sofreram declínio, 32,5% estão ameaçadas globalmente, 34 extintas e 88 estão prestes a serem extintas (LIPS et al. 2006). Muitas das vezes, tais declínios possuem relação à ocorrência de novos patógenos. (CAREY et al., 1999).

Neste contexto, a utilização de anfíbios como fonte de bactérias a serem utilizadas como controladores biológicos, gera significado econômico à importância da conservação, agregando não apenas valores a serviços ecossistêmicos, mas também destacando uma área até então não estudada sob esta perspectiva no território nacional.

#### 4. Considerações finais

Ainda não existem formas de manejo eficazes contra a fusariose e actranose, sendo assim, se torna necessário a criação de estratégias eficientes para o controle de tais doenças. O controle biológico, utilizando microrganismos, é uma maneira eficiente e sustentável para o manejo de fitopatologias.

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que os isolados bacterianos apresentados neste trabalho apresentam potencial antagônico

contra fungos de importância agrícola até então desconhecido, o que pode se apresentar como uma possibilidade promissora para o controle de doenças causadas pelos fungos *F. oxysporum* e *C. lindemuthianum* em plantas.

#### 5. Referências Bibliográficas

AL-MUGHRABI, K. I.; VIKRAM, A.; PETERS, R. D.; HOWARDS, R. J.; GRANT, L.; BARASUBIYE, T.; LYNCH, K.; POIRIER, R.; DRAKE, K. A.; MACDONALD, I. K.; LISOWSKI, S. L. I.; JAYASURIYA, K. E. Efficacy of *Pseudomonas syringae* in the management of potato tuber diseases in storage. *Biological Control*, v. 63, p. 315-322, 2013.

BERLEMAN, J. E.; KIRBY, J. R. Deciphering the hunting strategy of a bacterial wolfpack. *FEMS Microbiology Review*, v. 33, p. 942-57, 2009.

CAREY, C.; COHEN, N.; ROSSILNS-SMITH, L. Amphibian declines: na immunological perspective. *Developmental and Comparative Immunology*, 1999.

CORDEIRO, I. F. Análise sobre a composição da microbiota cutânea de anfíbios anuros em ambiente contaminado por arsênio. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, 113p, 2017.

CORDEIRO, I. F. *et. al.* Arsenic resistance in cultured cutaneous microbiota is associated with anuran lifestyles in the Iron Quadrangle, Minas Gerais State, Brazil. Ouro Preto, 2019.

DUELLMAN, W. E., & TRUEB, L. (1986). *Biology of amphibians*. McGraw-Hill Publishing Company, New York. 670p.

FRAVEL, D.R. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Reviews Phytopathology*, v.43, p.337-359, 2005.

GARCIA, F. A. O; ROMEIRO, R. S. Biocontrole da mancha-angular do feijoeiro

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

por antagonistas bacterianos. Brasília. v.46, n.12, p.1603-1608, dez. 2011

GERHARDSON, B. Biological substitutes for pesticides. Trends in Biotechnology, London, v. 20, n. 8, p. 338-343, 2002.

HAAS, D.; DEFAGO, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Nature Reviews Microbiology, v. 3, p. 307-319, Apr. 2005.

LIPS, K. R.; BREM, F.; BRENES, R.; REEVE, J. D.; ALFORD, R. A.; VOYLES, J.; CAREY, C.; LIVO, L.; PESSIER, A. P.; COLLINS, J. P. Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, (2006).

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F.; Plant-growth-promoting rhizobacteria. Annual Review Microbiology, v. 63, p. 541-556, Oct. 2009.

MYERS, N., MITTERMEIER, R. A., MITTERMEIER, C. G., FONSECA G. A., & KENT, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853-858.

RAAIJMAKERS, J. M.; MAZZOLA, M. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. Annual Review Phytopathology, v. 50, p. 403-424, 2012.

ROMEIRO, R. da S. Controle biológico de doenças de plantas: Fundamentos. Viçosa: Editora UFV, 2007a. 269p.

ROMEIRO, R. S.; GARCIA, F. A. O. Indução de resistência em plantas a patógenos por eliciadores de natureza bacteriana. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). Biocontrole de doenças de plantas: Uso e

perspectivas. Jaguaraúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 85-99, 2009.

TENORIO-SALGADO, S., TINOCO, R., VAZQUEZ-DUHALT, R., CABALLERO-MELLADO, J., PEREZ-RUEDA, E. 2013. Identification of volatile compounds produced by the bacterium *Burkholderia tropica* that inhibit the growth of fungal pathogens. Bioengineered 4, n.4, 236-243.

**ESTUDO DA GERAÇÃO DE ENERGIA EM DIFERENTES CONSTRUÇÕES  
DE CÉLULAS COMBUSTÍVEIS MICROBIANAS *SOIL BASED*****Cardozo<sup>1</sup>, M. H. A. L.; Leite<sup>2</sup>, V. C.; Matsumura<sup>3</sup>, B. P. M.; Ponciano<sup>4</sup>, J. A. P.; Araújo<sup>5</sup>, K. C.  
e Gonçalves<sup>6</sup>, M. M.**<sup>1</sup> Universidade Federal de São João del Rei, Engenharia de Bioprocessos<sup>2</sup> Universidade Federal de São João del Rei, Engenharia de Bioprocessos<sup>3</sup> Universidade Federal de São João del Rei, Engenharia Mecatrônica<sup>4</sup> Universidade Federal de São João del Rei, Engenharia de Bioprocessos<sup>5</sup> Universidade Federal de Viçosa, Microbiologia Agrícola<sup>6</sup> Universidade Federal de São João del Rei, Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de BioprocessosE-mail: [matheushcardozo@yahoo.com.br](mailto:matheushcardozo@yahoo.com.br)**1. Introdução**

O mundo moderno, já há várias décadas, se apoia na utilização de combustíveis não renováveis e poluentes. Além do impacto negativo no ambiente, o uso destes combustíveis em larga escala poderá levar ao desaparecimento de suas fontes pelo esgotamento de suas reservas planetárias. Uma grande parcela das alterações climáticas que ocorrem no planeta é atribuída ao aumento de gases na atmosfera provenientes da queima de combustíveis fósseis. (PIVA, 2010). Desse modo, nos últimos anos, tem havido o fomento à utilização e ao desenvolvimento de fontes alternativas, com o objetivo de substituir os combustíveis poluentes e reduzir os danos ao planeta (AZEVEDO, 2013).

Neste contexto, as células combustíveis microbianas (MFCs) têm se mostrado uma alternativa interessante, uma vez que são capazes de gerar energia elétrica e, concomitantemente, tratar efluentes potencialmente poluentes (RACHINSKI et. al., 2010). Em uma MFC é possível converter energia química em energia elétrica utilizando microrganismos para catalisar a oxidação de

matéria orgânica. (GRZEBYK, 2004 e RACHINSKI et. al., 2010).

Para a produção de energia elétrica, uma MFC opera com duas seções – uma primeira catódica e aeróbia e uma segunda anódica e anaeróbia. Por meio de um circuito elétrico externo, transferem-se elétrons, que são produzidos por microrganismos anaeróbios situados na seção anódica ao oxidar material orgânico, do ânodo para o cátodo, o que leva à produção de corrente elétrica. (CARVALHO, 2010). A matéria orgânica tratada pode ser proveniente, por exemplo, de efluentes das indústrias de processamento de alimentos ou vindos da pecuária de animais em regime de confinamento, que são grandes poluentes ambientais. Assim, ao passo que trata um efluente, por retirar dele parte de sua carga orgânica, há geração de energia na MFC. Dentre as principais aplicações das células combustíveis microbianas, destacam-se a sua utilização em sensores ambientais, no tratamento de resíduos agroindustriais e em seu emprego como fonte de energia autossustentável (RACHINSKI et. al., 2010).

São conhecidas várias configurações para uma MFC, podendo ser compostas por um ou

dois compartimentos, possuir ou não membrana semipermeável e utilizar diferentes eletrodos e materiais de construção (LEHEN, 2014). Um dos tipos de MFC é a *Soil-Based*, que segue os mesmos princípios básicos de uma MFC, mas é mais simples e de menor custo, uma vez que utiliza solo como meio anódico rico em nutrientes, como inóculo – pois abriga vasta diversidade microbológica – e também como membrana de troca de prótons (ENVIS CENTER, 2014). Dessa forma, este trabalho teve o objetivo de fazer um estudo inicial com diferentes construções de MFC *Soil-Based* e verificar, dentre elas, o melhor modelo para produção de energia elétrica.

## 2. Materiais e métodos

A metodologia proposta foi adaptada para uma *Soil-Based* de acordo com o trabalho de Liu, et al., 2005. Para isso, foram construídas quatro MFCs com os materiais e medidas expostos na Tabela 1, sendo que apenas a MFC 1 foi montada completamente fechada (Figura 1).

Tabela 1- Características de construção das MFCs

MFC	Material	Eletrodo	Dimensões em mm (diâmetro × altura)	Altura de solo em mm
1	PVC	Aço	150 × 220	110
2	PET	Aço	90 × 270	140
3	PVC	Aço	75 × 620	320
4	PET	Ferro	90 × 270	140

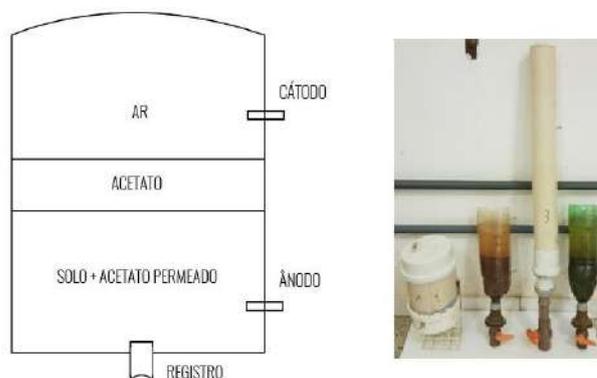


Figura 1- Esquema e fotografia das MFCs

Adicionou-se a cada uma das MFCs 1 kg de solo e 1 L de solução de acetato de zinco na concentração de 800 mg/L. Usando um multímetro, mediu-se, a cada 30 minutos após a adição da solução de acetato, a diferença de potencial (ddp) entre os eletrodos das MFCs. Repetiu-se os testes por quatro dias para cada uma das MFCs, sendo que, a cada 24 horas, foi retirado o resíduo da solução de acetato e as células de combustíveis microbianas foram realimentadas. Por fim, analisou-se a consistência das medições através de métodos estatísticos.

## 3. Resultados e Discussão

Os valores encontrados nas medições durante os quatro dias estão foram usados para gerar os gráficos das Figuras 2, 3, 4 e 5.

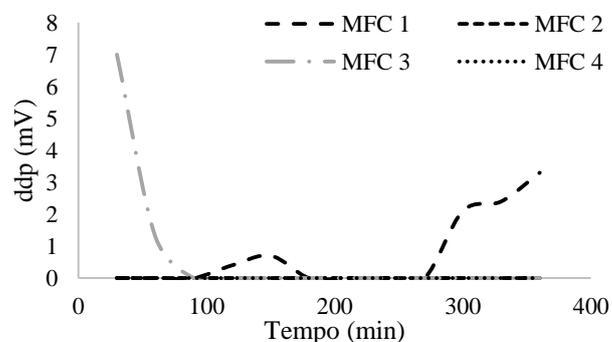


Figura 2- Resultados das medições do primeiro dia

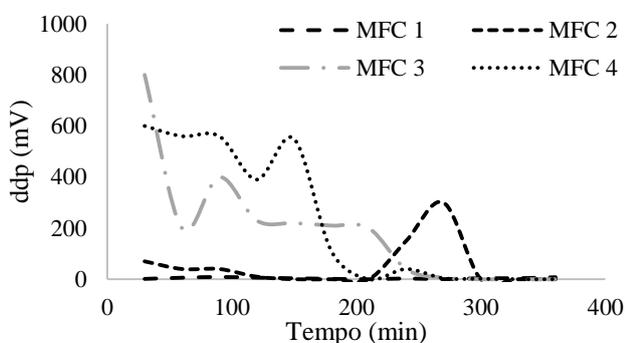


Figura 3- Resultados das medições do segundo dia

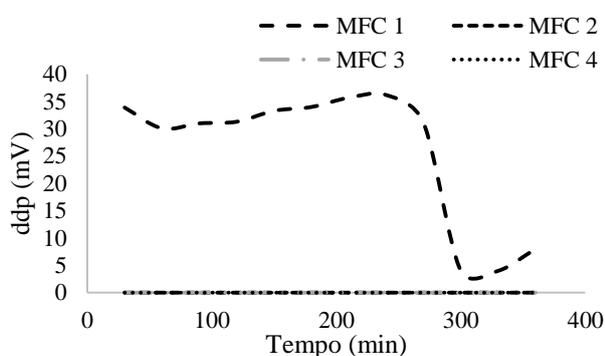


Figura 4 - Resultados das medições do terceiro dia

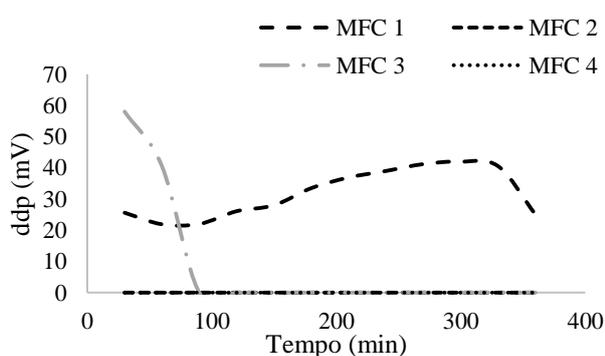


Figura 5- Resultados das medições do quarto dia

Analisando os valores, é possível observar que os resultados do segundo dia para as MFCs 2, 3 e 4 destoam dos resultados dos demais dias. Essa discrepância se justifica pelo fato de que, nesse dia, as MFCs 2, 3 e 4 estiveram com seu catodo submerso na solução de acetato de zinco durante as medições, ao passo que, nos outros dias, os catodos de todas as MFCs estiveram não submersos. Com base nisso, faz-se oportuno a

realização de novos testes para cada uma das MFCs com seus catodos submersos, haja à vista que esses dispositivos podem ser empregados com catodo submerso ou exposto ao ar, e essa diferença nas configurações pode causar interferência nos valores das medições (MARCON, 2011). Em virtude da desigualdade de condição entre o segundo dia e os demais, apenas as medições do primeiro, terceiro e quarto dias foram utilizadas na análise dos resultados.

Observando as Figuras 2, 3 4 e 5, nota-se que a MFC 1 apresentou resultados regulares e contínua geração de ddp. Somando a isso o fato de que os valores obtidos nas MFCs 2 3 e 4, serem, em sua maior parte, 0mV, é possível inferir que, dentre os modelos testados, a MFC 1 apresentou as melhores características de construção – em PVC, com tampa, eletrodo de aço, 150 mm de altura e 220 mm de diâmetro – para produção de energia elétrica.

Além disso, percebe-se que, para a MFC 1, as menores medidas ocorreram no primeiro dia, e as maiores no quarto dia. Esse resultado é esperado, pois os microrganismos, que são responsáveis pela produção dos elétrons e conseqüente geração de ddp, se multiplicam rapidamente quando se encontram em condições ambientais satisfatórias (HOFFMANN, 2001). Assim, se há multiplicação dos microrganismos, há maior geração de elétrons, e as medidas de tensão (ddp) tendem a ser maiores.

Ainda que os valores de tensão obtidos nesse trabalho sejam baixos – na ordem de milivolts –, percebe-se que esta configuração da MFC pode ser trabalhada visando sua otimização. Estudos anteriores utilizaram capacitores e conversores para contornar o problema (VAN GINKEL et al, 2005) ou associação de várias células para obtenção de quantidades significativas de energia elétrica (RACHINSKI, et al. 2010). Trabalhos futuros



## II SIMPÓSIO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil



Universidade Federal  
de São João del-Rei

deste grupo também pretendem avaliar a eficiência desta MFC na redução da carga orgânica de efluentes.

#### 4. Agradecimentos

Agradecemos ao Ministério da Educação pelo apoio financeiro por intermédio do Programa de Educação Tutorial (PET).

#### 5. Conclusão

De acordo com os dados obtidos, constata-se que a estrutura da *MFC Soil-Based* é realmente capaz de gerar energia e, por esse motivo, é uma alternativa promissora no ramo da sustentabilidade. Com base nos resultados, observa-se que a MFC 1 apresentou valores melhores e mais regulares quando comparado com as demais MFCs. Foi possível perceber ainda que a configuração, o eletrodo utilizado e a forma de exposição ao ar foram fatores influenciáveis na geração de dpp, levando à necessidade de mais estudos para determinar quais são as condições que favorecem a geração de energia elétrica em uma MFC.

#### 6. Referências Bibliográficas

- AZEVEDO, P.J.S. **Uma análise dos efeitos da crise econômica-financeira sobre as políticas de incentivo às energias renováveis**. Dissertação. Universidade do Porto, 2013
- CARVALHO, T. J. L. **Estudo da produção de energia eléctrica a partir de uma célula de combustível microbiana**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade do Porto, Porto, Portugal. 2010.
- ENVIS CENTER, **Microbial Fuel Cells**. v.25. p.16, 2014.
- GRZEBYK, P.; **Sep. Purif. Technol.** 2004, 41, 321.
- HOFFMANN, F. L. **Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos**. Brasil alimentos, 2001.
- LEHNEN, D. R. 2014. **Desenvolvimento de células de combustível microbianas**. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2014.
- LEHNEN, D. R. **Desenvolvimento de células de energia microbiana**. Dissertação de mestrado. Porto Alegre, 2014.
- LIU, H.; CHENG, S.; LOGAN, B. E. **Production of electricity from acetate or butyrate in a single chamber microbial fuel cell**. *Environ. Sci. Technol.* 39 (2), 658-662. 2005.
- MARCON, L. R. C. **Potencialidade da célula combustível microbiana para geração de energia elétrica a partir de esgoto sanitário**. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2011.
- PIVA, R. B. **Economia ambiental sustentável: os combustíveis fósseis e as alternativas energéticas**. Porto Alegre, 2010.
- RACHINSKI, S.; CARUBELLI, A.; MANGONI, A. P.; MANGRICH, A. S. **Pilhas de combustíveis microbianas utilizadas na produção de eletricidade a partir de rejeitos orgânicos: uma perspectiva de futuro**. *Quím. Nova*, vol.33 no.8. São Paulo, 2010.
- VAN GINKEL, S. W.; OH S. E.; LOGAN B. E.; **Biohydrogen gas production from food processing and domestic wastewaters**. *Int. J. Hydrogen Energy*. 2005.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

## AVALIAÇÃO DO EFEITO VIRUCIDA EM EXTRATOS DE FOLHAS E GALHOS DE *Tontelea* sp. CONTRA O FLAVIVÍRUS ZIKA.

Hauck, M.S.<sup>1</sup>; Justino, E.A.P.<sup>2</sup>; Silva, B.M.<sup>2</sup>; Corrêa, B.H.B.C.<sup>2</sup>; Ferreira, F.L.<sup>3</sup>; Oliveira, M.A.B.R.<sup>1</sup>; Vieira-Filho, S.A.<sup>3</sup>; Duarte, L. P.<sup>3</sup>; Magalhães, J. C.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Viçosa, MG, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Alto Paraopeba, Laboratório de Microbiologia e Enzimologia, Ouro Branco, MG, Brasil.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de química, Instituto de Ciências exatas, Belo Horizonte, MG, Brasil.

E-mail: marcelahauck20@gmail.com

### 1. Introdução

O Zika virus (ZIKV) pertence à família Flaviviridae, gênero Flavivirus, e faz parte do grupo conhecido como Arbovírus (*Arthropod-born virus*), os quais são vírus cuja forma de transmissão ocorre através de artrópodes hematófagos (FIGUEIREDO, 2007).

Isolado primeiramente em macacos do gênero *Rhesus* na floresta Zika, na Uganda em 1947, o Zika virus, antes classificado como uma arbovirose animal, rapidamente foi capaz de infectar humanos, tendo o primeiro relato em 1952 (MACNAMARA, 1954). Sua disseminação através dos vetores ocorre principalmente por mosquitos do gênero *Aedes*, o que tornou a febre Zika uma doença endêmica, concomitantemente à Dengue e à Chikungunya (CAYLÀ *et al.*, 2016).

Até o presente momento, não há vacina para a prevenção da febre Zika ou drogas antivirais específicas contra o vírus. Diante disso, a comunidade científica busca novas moléculas antivirais (WEAVER, REISEN, *et al.*, 2010; YASUHARA-BELL, 2010).

Tratamentos fitoterápicos são de grande importância para a medicina, uma vez que possuem baixa citotoxicidade, e também pelo fato de as plantas possuírem alta complexidade química, o que pode proporcionar o aumento da aplicabilidade. Normalmente, as moléculas são também de

fácil degradação no meio ambiente. Na medicina popular, produtos naturais são ingeridos na forma de infusão aquosa, o que gera uma série de tratamentos fitoterápicos e garantem melhorias, muitas vezes, comprovadas pela ciência (SPINDOLA *et al.*, 2014).

Com base nisso, abordamos como objeto de estudo a família de plantas *Celastraceae*, a qual é constituída por 98 gêneros e abrange cerca de 1260 espécies. As espécies do gênero *Tontelea* são encontradas com grande abundância no estado de Minas Gerais. A espécie em estudo apresenta uso fitoterápico como por exemplo, os extratos alcoólicos de suas raízes são utilizados para tratamentos renais e os óleos obtidos de seus frutos são aplicados em tratamentos anti-inflamatórios (MERCADANTE-SIMÕES, *et al.*, 2014; ARAÚJO, *et al.*, 2017).

Devido à inexistência de terapias ou vacinas disponíveis contra o *Zika*, o desenvolvimento de fármacos específicos torna-se importante, uma vez que não há interrupção do ciclo de infecção de tal patógeno. Dessa forma, visando à ação específica contra o ciclo de multiplicação sem causar toxicidade ganha destaque, principalmente com o número crescente de casos dessa arbovirose no país desde 2015. Com isso, o objetivo deste estudo é a

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

bioprospecção de atividade antiviral contra o Zika virus em isolados obtidos de extratos folhas de *Tontelea* sp. e iniciar a caracterização de possíveis mecanismos de ação antiviral.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Células e vírus

As células Vero, originadas de rim de macaco verde, *Cercopithecus aethiops*, foram empregadas para os diferentes ensaios. Foram mantidas em meio DMEM, com 5% de soro fetal bovino (SFB) e um coquetel de antibióticos. As células foram mantidas a 37°C, em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> e foram repicadas em intervalos de 3 dias. As células C6/36, originadas do mosquito *Aedes Albopictus*, foram utilizadas para multiplicação viral. Essas células foram mantidas a 20°C, em meio de cultura L-15 com 5% de SFB e um coquetel de antibióticos, sendo repicadas semanalmente.

As cepas de Zika virus (ZIKV), obtidas da Universidade Federal de Ouro Preto, foram multiplicadas em células C6/36, sendo as culturas infectadas incubadas até o aparecimento de 80-90% de efeito citopático viral (ECP), caracterizado pela formação de sincícios, grumos e desprendimento celular. Posteriormente, o sobrenadante foi clarificado por centrifugação a 4°C, alíquotado e armazenado a -80°C até o uso.

### 2.2. Extratos de *Tontelea* sp.

Os extratos de folhas e galhos de *Tontelea* sp. foram cedidos pelo Grupo de Pesquisa em Plantas Mediciniais da Universidade Federal de Minas Gerais (NEPLAM/UFMG).

### 2.3. Ensaio de Citotoxicidade

Antes dos testes antivirais, os compostos foram submetidos a teste de citotoxicidade, o qual determina a concentração citotóxica para 50% das células (CC<sub>50</sub>). As células foram distribuídas em microplacas de 96 poços e incubadas. No dia seguinte, foram tratadas com concentrações dos extratos e incubadas.

Após 48h, pela adição de metil-tiazol-tetrazólio (MTT), foi feita a revelação da % de células viáveis pela equação  $\% = (B \div A) \times 100$ , em que A e B são as absorbâncias ( $\lambda = 540\text{nm}$ ) das células não tratadas e células tratadas, respectivamente.

### 2.4. Ensaio de atividade antiviral global

Foram testadas na atividade antiviral, os extratos em concentrações abaixo da CC<sub>50</sub>. Para isso, células foram distribuídas em microplacas e incubadas por 24h. As diluições dos compostos foram adicionadas juntamente com a suspensão viral (MOI = 0,1 vírus/cél) e após 48h, o MTT foi aplicado. A concentração com proteção de 50% das células infectadas (CE<sub>50</sub>) foi calculada como:  $[(A - B) \div (C - B)] \times 10$ , sendo A: densidade óptica (DO) das células tratadas e infectadas, B, das não tratadas e infectadas, e C, das não tratadas e não infectadas. A pesquisa foi feita conforme descrito por Barrow *et al.*, 2016, com algumas modificações.

### 2.5. Análise do efeito virucida

Para análise do efeito virucida dos extratos, uma placa de 24 poços foi confeccionada 24h anteriores ao experimento. O vírus foi tratado previamente à infecção com diferentes concentrações dos extratos por 1h, e em seguida realizou-se a infecção das células. Após 1h da infecção, removeu-se o inóculo e adicionou-se meio semissólido e incubou-se por 48h a 37°C. O ensaio foi revelado por meio da fixação com formaldeído e corando com cristal violeta, com a finalidade de visualizar placas de lise.

## 3. Resultados e discussão

### 3.1. Citotoxicidade, atividade antiviral global e índice de seletividade

Os ensaios de citotoxicidade buscam avaliar o efeito da toxicidade dos extratos em células, e de acordo com Ramos e colaboradores (2008), valores maiores que 100 µg/mL indicam que o extrato provavelmente não possui toxicidade.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

Na tabela 1 estão dispostos os valores das concentrações citotóxicas, protetora e índices de seletividade para cada extrato testado contra o ZIKV. Para a atividade antiviral global, Clain e colaboradores (2019) investigaram o potencial antiviral de extrato rico em polifenol de *Psiloxylon mauritianum*, planta medicinal típica da região da Ilha da Reunião, e mostraram que possui atividade antiviral contra o Zika vírus, tendo encontrado a concentração para proteção de 50% das células de 19,5 µg/mL, valor próximo ao encontrado em nosso estudo.

Com os resultados de  $CC_{50}$  e  $CE_{50}$ , foi possível calcular o índice de seletividade, que consiste na razão entre a concentração citotóxica e a concentração protetora, e de acordo com Barros e colaboradores (2011), índices de seletividade maiores que 4 implicam que a ação inibitória do vírus acontece de forma pelo menos duas vezes mais baixa que a ação citotóxica, o que indica que o extrato age de maneira eficaz sem a geração de resultados falso-positivos.

Tabela 1: Concentrações citotóxica, protetora e índices de seletividade para os extratos de folhas e galhos de *Tontelea* sp.

Extrato	Concentração Citotóxica ( $CC_{50}$ )	Concentração Protetora ( $CE_{50}$ )	Índice de Seletividade (IS)
TFAE	224,96	74,19	3,03
TFM	351,47	83,05	4,23
TGC	370,78	38,52	9,6
TGH	181,91	38,66	4,70

Conforme observado, os valores encontrados para os extratos testados apresentaram baixa citotoxicidade, uma vez que foram superiores ao recomendado na literatura. Ainda na tabela 1, as concentrações protetoras apresentaram resultados satisfatórios, uma vez que as concentrações encontradas variaram de 38 a 83 µg/mL.

### 3.2. Avaliação do efeito virucida

Virucida é o nome dado ao composto que tem capacidade de interagir com o vírus de maneira que impeça a infecção antes mesmo de seu contato com a célula hospedeira. A

figura 1 A e B ilustram os resultados obtidos para os extratos de folhas (TFAE e TFM) e de galhos (TGC e TGH), respectivamente, e pode-se observar que mesmo na menor concentração testada (15,6 µg/mL) não houve formação de placas de lise viral para todos os extratos.

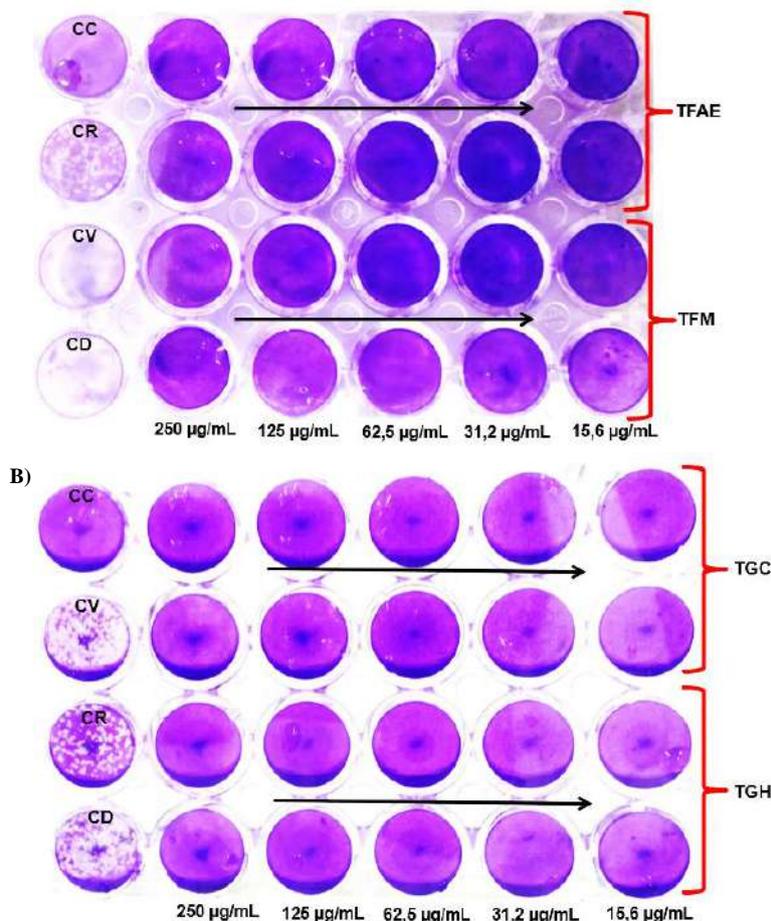


Figura 1: A) Avaliação da atividade virucida dos extratos de folhas (TFAE e TFM) contra o ZIKV. B) Avaliação da atividade virucida dos extratos de galhos (TGC e TGH) contra o ZIKV. O poço denominado CC refere-se ao controle celular (Células não infectadas e não tratadas); o poço CD refere-se ao controle de veículo (Células infectadas com o inóculo viral tratado com DMSO a 20%); CR corresponde ao controle de Ribavirina (Células infectadas com o inóculo viral tratado com 200 µg/mL de ribavirina); os poços representados como CV referem-se ao controle viral (Células apenas infectadas com vírus não tratados).

De maneira semelhante, Kohn e colaboradores (2012), mostraram que extratos de *Maytenus ilicifolia* foram capazes de inibir a infecção viral do herpesvírus bovino em uma

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

concentração de 25 µg/mL. Kanyara e Njagi (2005) também testaram extratos de plantas da família *Celastraceae* foram capazes de bloquear a infecção viral do HIV-10 em concentrações variadas de 30 a 50 µg/mL, concentrações inferiores às encontradas nesse estudo.

#### 4. Conclusão

Um composto antiviral mais eficiente é aquele capaz de inibir algumas etapas de multiplicação viral de maneira que não interfira diretamente na célula hospedeira, o que possibilita a recuperação da infecção pela célula e a manutenção da atividade metabólica viável. Conforme observado, os extratos de *Tonatelea* sp. possuem capacidade de agir em bloqueando a infecção viral e, dessa forma, estudos de compostos promissores presentes nesses extratos suscitaram estudos futuros de caracterização dos mecanismos de ação dos extratos.

#### 5. Referências bibliográficas

ARAÚJO, A. R.B., *et al.* Physicochemical profile of the oil from the seed of *Tonatelea micrantha* (Celastraceae), In South African Journal of Botany, Volume 112, 2017, Pages 112-117, ISSN 0254-6299, <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.05.009>.

BARROS, C., MOURA, L., BRITO, L. M. & MATOS, O. "Atividade antimicrobiana de extractos e óleos essenciais de coentro, oregão e poejo, e seu potencial para a proteção das culturas em horticultura biológica" 3º Colóquio Nacional de Horticultura e 1º Colóquio Nacional de Produção Animal Biológica, 2011.

BARROWS, N. J.; *et al.* A Screen of FDA-Approved Drugs for Inhibitors of Zika Virus Infection. 2016, Cell Host & Microbe 20, 259–270 August 10, 2016 Elsevier Inc.

CAYLÀ, J.A.; *et al.* Zika virus infection: a new public health emergency with great media impact. Gaceta Sanitaria, 2016 Jul 26.

CLAIN, E.; *et al.* The Polyphenol-Rich Extract from *Psiloxylon mauritianum*, an Endemic Medicinal Plant from Reunion Island, Inhibits the Early Stages of Dengue and Zika Virus Infection. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1860.

FIGUEIREDO, L.T.M. Emergent arboviruses in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, p. 224-229, 2007.

KANYARA, J. N.; NJAGI, E. N. M. Anti-HIV-1 Activities in Extracts From Some Medicinal Plants as Assessed in *in vitro* Biochemical HIV-1 Reverse Transcriptase Assay. *Phytotherapy research*, nº 19, p 287 – 290, 2005.

KOHN, L.K.; QUEIROGA, C.L.; MARTINI, M.C.; BARATA, L.E.; PORTO, P.S.; SOUZA, L.; ARNS, C.W. Atividade antiviral *in vitro* de plantas brasileiras (*Maytenus ilicifolia* e *Anibarosaeodora*) contra o herpesvírus bovino tipo 5 e metapneumovírus aviária. *Pharm Biol.* v 50 (10):1269-75, 2012.

MACNAMARA, F.N. 1954. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 48:139–145. doi:10.1016/0035-9203(54)90006-1.

MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; *et al.* A. Structure, histochemistry and phytochemical profile of the bark of the sobol and aerial stem of *Tonatelea micrantha* (Celastraceae - Hippocrateoideae). *An. Acad. Bras. Ciênc.* 2014 Sep; 86(3): 1167-1179.

RAMOS, D. F. *et al.* Investigation of the antimycobacterial activity of 36 plant extracts from the brazilian Atlantic Forest. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.*, São Paulo, v. 44, n. 4, p. 669-674, Dec. 2008.

SPINDOLA, K.C.W., *et al.* Anti-Mayaro virus activity of *Cassia australis* extracts (Fabaceae, Leguminosae). *Parasites & Vectors*, v. 7, 2014.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K., Present and future arboviral threats, In *Antiviral Research*, Volume 85, Issue 2, 2010, Pages 328-345, ISSN 0166-3542, <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.008>.

YASUHARA-BELL, J.; YUANAN, L. Marine compounds and their antiviral activities. *Antiviral Research*, v. 86, p.231–224, 2010.

#### 6. Apoio financeiro

Agradecemos aos órgãos de fomento FAPEMIG, UFSJ e CNPQ pelo apoio financeiro.

**PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ANTIMICROBIANOS  
NA GRUTA MARTIMIANO II, PARQUE ESTADUAL DO IBITIPOCA – MG****Guerra<sup>1,2</sup>, L. C. C.; Lemes<sup>1</sup>, C. G. C.; Lima<sup>2</sup>, P. E. S. e Moreira<sup>1</sup>, L. M.**<sup>1</sup> Universidade Federal de Ouro Preto, Laboratório de Genômica e Interação Bactérias-Ambiente, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Ouro Preto MG.<sup>2</sup> Universidade Federal de Ouro Preto, Sociedade Excursionista e Espeleológica, Ouro Preto MG.

E-mail: laraguerra.bio@gmail.com

**1. Introdução****1.1. Gruta Martimiano II**

A Gruta Martimiano II se localiza no Parque Estadual do Ibitipoca e é considerada a mais extensa caverna em quartzito do Brasil, com 4.170 m de projeção horizontal e 170 m de desnível. A gruta coleciona características únicas que a fazem notória no cenário nacional (LIMA *et al.*, 2017). Nesse contexto, a Gruta Martimiano II pode se apresentar como um importante reservatório de microbiota com função biológica específica.

**1.2. Ambiente cavernícola**

As cavernas são caracterizadas pela ausência de luz nas zonas mais profundas, escassez nutricional, taxas de umidade próximas a saturação e a temperatura do meio hipógeo se aproxima da média anual de temperatura do ambiente epígeo (GOMES *et al.*, 2000). Estas características propiciam um habitat microbiano único, com pressões evolutivas diferentes do ambiente epígeo (BARTON *et al.*, 2007).

**1.3. Potencial biotecnológico dos microrganismos**

Na biotecnologia, a diversidade e o potencial bioquímico dos microrganismos são essenciais para o desenvolvimento de produtos e serviços com aplicações em praticamente todos os setores industriais.

Fatores como baixo custo de produção, alta produtividade, estabilidade a temperaturas extremas, especificidade, pH ou outras condições fisiológicas fazem com que o estudo

de bactérias em ambientes peculiares, como o cavernícola, seja uma alternativa em destaque na busca por novos medicamentos (PRAKASH *et al.*, 2013). Assim, as pressões seletivas do ambiente podem favorecer grupos de bactérias com capacidade de produção de antimicrobianos (BARTON *et al.*, 2007)

Embora as cavernas apresentem tais peculiaridades, estes são ambientes pouco estudados do ponto de vista biotecnológico, especialmente no Brasil, o que coloca a proposta deste trabalho em evidência na busca de novos organismos e conhecimentos biológicos que possam ser utilizados na geração de produtos e serviços.

**2. Material e métodos****2.1. Coleta do material microbiológico**

Uma análise do mapa topográfico da Gruta Martimiano II foi previamente estabelecida para determinação dos pontos de relevância para a realização de coletas de solo e rochas.

Foram utilizados materiais esterilizados para a coleta. Para cada ponto da caverna foram coletados pelo menos uma amostra de piso, uma de parede e uma de teto, geralmente em torno de 50 g de material sólido. As amostras foram levadas para o Laboratório de Genômica e Interação Bactérias-Ambiente da Universidade Federal de Ouro Preto.

**2.2. Isolamento das colônias bacterianas**

Posteriormente, 1g de material foi lavado em 10 mL de água de torneira autoclavada. As soluções dos lavados foram diluídas em fatores de 1:10 e 1:100. 100 µL desta solução diluída

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

foi plaqueada em placas de Petri contendo meio de cultura Luria-Bertani (LB) (FELESTRINO, 2017). As placas foram incubadas a 28°C por um período de até três dias, e as colônias que apresentaram diferentes morfologias foram repicadas em novas placas de Petri contendo o mesmo meio a fim de isolá-las. Os isolados foram preservados em LB líquido contendo glicerol e estocados em freezer -20°C.

### **2.3. Ensaio de inibição direta**

Foram colocados 1000 µL de LB líquido e 5 µL do preservado de *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* em tubos de 1,5 ml e para crescer no Shaker à 28°C e 180 RPM, por dois dias. Posteriormente, 20 µL dos patógenos foram espalhados com drigalsky em placas de Petri (150 x 15mm) com meio LB sólido, formando uma manta microbiana.

Com um multi-inoculador os isolados da caverna foram inoculados nas placas de Petri. Os halos de inibição do isolado de maior potencial foram medidos com um paquímetro.

### **2.4. Ensaio de caracterização do composto inibitório**

Em placa de Petri (90 x 15mm) com meio LB, foi colocado celofane semipermeável autoclavado e espalhou-se com o drigalsky 200 µL do isolado de maior interesse sobre o celofane, o crescimento foi observado por 1 dia à 28 °C, após o crescimento, o celofane com o isolado foi retirado da placa e descartado. No centro da placa adicionou-se 2 µL da bactéria patogênica, o crescimento foi observado por 2 dias à 28 °C. Este método foi modificado do trabalho de Nourozian *et al.* (2006).

### **2.5. Ensaio de caracterização quanto a motilidade**

O isolado de maior potencial foi cultivado em meio LB semi-sólido (3% de ágar) por 2 dias a 28°C, em duplicata.

### **2.6. Ensaio de caracterização de Gram**

Foi realizado seguindo o protocolo do Ministério da Saúde (1997).

## **Resultados e discussão**

### **3.1. Isolados bacterianos e descrição das áreas de coleta**

Obteve-se um total de 72 isolados, que geraram um banco de isolados bacterianos.

Algumas áreas apresentaram maior número de colônias isoladas, tal fato pode ser explicado pela proximidade da área a uma drenagem ativa, por onde ocorre o carregamento de matéria orgânica do ambiente. Sendo que, segundo Gilbert *et al* (1994), os cursos d'água são um dos principais transportadores de recursos alimentares para o ambiente hipógeo.

### **3.2. Inibição direta**

6 isolados apresentaram possível inibição do crescimento da bactéria *Klebsiella pneumoniae*, um deles em especial foi capaz de inibir o crescimento de *K. pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*.

Os halos de inibição foram medidos, sendo que para *S. aureus* os halos de inibição foram de 2,24 mm e 3,95 mm e para *K. pneumoniae* os halos medidos foram de 0,31 mm e 0,63 mm.

A resistência de microrganismos a antibióticos se tornou um grande problema social, e econômico, sendo que algumas bactérias já são resistentes a todos os antibióticos conhecidos (AMINOV, 2010). Devido a isso, é de extrema importância a busca por novos antibióticos.

A bactéria *K. pneumoniae* pertence à família Enterobacteriaceae, é Gram-negativa e está presente naturalmente no trato digestivo e respiratório humano (BROOKS *et al.*, 2005). Quando patogênica, a *K. pneumoniae* é o agente causador de diversas doenças, como a pneumonia e a infecção do trato urinário (RAHAMATHULLA *et al.*, 2016). Este patógeno causa um grande impacto no setor da saúde e segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) é uma das 9 bactérias resistentes a diversos antibióticos, juntamente com a *S. aureus* (WHO, 2014).

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

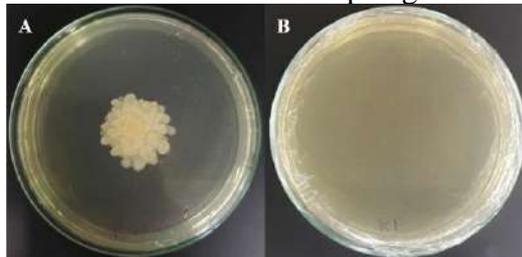
Por outro lado, *S. aureus* é Gram-positiva, pertence à família Micrococcaceae, e o ser humano é um reservatório natural desta bactéria (LOWY, 1998). *S. aureus* é um patógeno oportunista e pode causar infecções simples e infecções severas, como a bacteremia, septicemia e endocardite (LOWY, 1998).

Os resultados positivos para a inibição direta de *K. pneumoniae* pode estar vinculada com a destruição da parede celular do alvo, sendo que os mesmos isolados não foram capazes de inibir o crescimento de uma bactéria Gram-positiva, com exceção de um isolado.

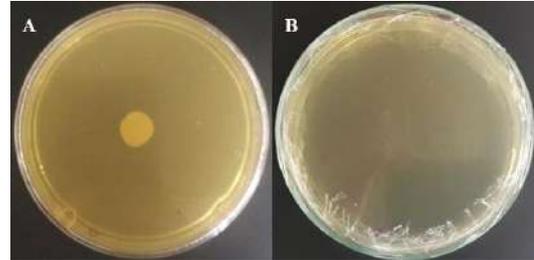
Este isolado em especial foi capaz de inibir o crescimento de ambos patógenos testados o que pode estar relacionado a outros mecanismos de inibição, como por exemplo o bloqueio da expressão e da tradução (COTTER *et al.*, 2013) e a inibição da divisão celular (BISSON-FILHO *et al.*, 2015).

### 3.3. Caracterização do composto inibitório

No teste de inibição indireta com o isolado de maior potencial, ocorreu a inibição total do crescimento de *K. pneumoniae* (Figura 1) e a inibição total do crescimento de *S. aureus* (Figura 2). Segundo Nourozian (2006), a inibição percentual da área de crescimento do patógeno deveria ser calculada, mas o composto antimicrobiano produzido pelo isolado GMP4.22, foi capaz de impedir totalmente o crescimento dos patógenos.



**Figura 1:** Ensaio de inibição do crescimento de *K. pneumoniae* por compostos liberados pelo isolado testado. A) Placa controle com crescimento normal de *K. pneumoniae*; B) Placa com os compostos liberados pelo isolado mostrando a inibição total do crescimento de *K. pneumoniae*.



**Figura 2:** Ensaio de inibição do crescimento de *S. aureus* por compostos liberados pelo isolado testado. A) Placa controle com crescimento normal de *S. aureus*; B) Placa com os compostos liberados pelo isolado mostrando a inibição total de *S. aureus*.

A inibição indireta pode ocorrer com a liberação de um composto secundário difusível no ambiente (ORAKCI *et al.*, 2010). Além disso, a liberação do composto inibitório indica que o mesmo é produzido naturalmente, não sendo necessário um estímulo competitivo com outro microrganismo, o que é uma característica facilitadora para o processo de desenvolvimento e para a produção em larga escala de um antibiótico.

### 3.4. Motilidade do isolado GMP4.22

No ensaio de caracterização do isolado de maior potencial quanto a motilidade a bactéria apresentou resultado positivo.

A motilidade é uma vantagem adaptativa, por propiciar maior sucesso em relações antagônicas com outros microrganismos, facilitar a busca por nutrientes (BUTLER, 2010) e pode melhorar a ação antimicrobiana do isolado.

### 3.5. Caracterização de Gram

O isolado testado foi classificado como Gram-negativo. Segundo Koch (1992), as paredes celulares de bactérias Gram-negativas são resistentes o suficiente para suportar temperaturas e pHs extremos e são elásticas, o que pode explicar o sucesso evolutivo.

### Conclusões

Esta pesquisa gerou o primeiro banco de isolados bacterianos da Gruta Martimiano II e abriu a perspectiva para o desenvolvimento de pesquisas voltadas para o potencial biotecnológico de bactérias desta gruta.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

° isolado que inibiu os 2 patógenos é promissor quanto ao desenvolvimento de um novo antibiótico e este será identificado por sequenciamento do gene 16S usando NGS (Sequenciamento de Nova Geração), dando continuidade à pesquisa.

### 3. Referências bibliográficas

- AMINOV, Rustam I. **A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future.** *Frontiers in microbiology*, v. 1, p. 134, 2010.
- FELESTRINO, E. B. *et al.* **Alcaligenes faecalis associated with *Mimosa calodendron* rhizosphere assist plant survival in arsenic rich soils.** *Journal of soil science and plant nutrition*, v. 17, n. 4, p. 1102-1115, 2017.
- BARTON, H. A. *et al.* **The impact of rock geochemistry on bacterial community structure in oligotrophic cave environments.** *International Journal of Speleology*, v.36, n. 2, p. 93-104, 2007.
- BISSON-FILHO, Alexandre W. *et al.* **FtsZ filament capping by MciZ, a developmental regulator of bacterial division.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, n. 17, p. E2130-E2138, 2015.
- BROOKS, G. F., J.S. BUTEL, & S.A. MORSE. **Medical Microbiology.** Edition 1, Jakarta, 2005.
- BUTLER, Mitchell T.; WANG, Qingfeng; HARSHEY, Rasika M. **Cell density and mobility protect swarming bacteria against antibiotics.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 8, p. 3776-3781, 2010.
- COTTER, Paul D.; ROSS, R. Paul; HILL, Colin. **Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics?.** *Nature Reviews Microbiology*, v. 11, n. 2, p. 95, 2013.
- GILBERT, J., DANIELPOL, D. L. & STANFORD, J. A. **Groundwater Ecology.** Academic Press Limited, San Diego, California. 571 pp, 1994.
- GOMES, F.T.M.C.; FERREIRA, R.L. & JACOBI, C.M. **Comunidade de artrópodes de uma caverna calcária em área de mineração: composição e estrutura.** *Rev. bras. de Zootecias*, V.2, n.1, p.77-96, 2000.
- KOCH, Arthur L.; WOESTE, Steven. **Elasticity of the sacculus of *Escherichia coli*.** *Journal of bacteriology*, v. 174, n. 14, p. 4811-4819, 1992.
- LIMA, P. E. S.; *et al.* **Caracterização geoespeleológica preliminar da Gruta Martimiano II, Santa Rita de Ibitipoca – MG.** 34 Congresso Brasileiro de Espeleologia, 2017.
- LOWY, Franklin D. ***Staphylococcus aureus* infections.** *New England journal of medicine*, v. 339, n. 8, p. 520-532, 1998.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Técnica de Coloração de Gram.** Brasília: Ministerio da Saúde, 1997.
- NOUROZIAN, Javad *et al.* **Biological control of *Fusarium graminearum* on wheat by antagonistic bacteria.** *Songklanakarin J. Sci. Technol*, v. 28, n. Suppl 1, p. 29-38, 2006.
- ORAKCI, Guel Erginbas *et al.* **Selection of antagonistic actinomycete isolates as biocontrol agents against root-rot fungi.** *Fresenius Environ. Bull*, v. 19, p. 417-424, 2010.
- PRAKASH, Divya *et al.* **Actinomycetes: a repertory of green catalysts with a potential revenue resource.** *BioMed research international*, v. 2013, 2013.
- RAHAMATHULLA, M.P., B.N. HARISH, L. MATASEJE, & M.R. MULVEY. **Carbapenem resistance mechanisms among blood isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*.** *Journal. Microbiol.* 10:45-53, 2016.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance.** WHO, 2014.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

## ESTUDO DA REMOÇÃO DE DQO E SULFATO EM CÉLULAS DE ENERGIA MICROBIANA UTILIZANDO DIFERENTES MEMBRANAS

Assumpção<sup>1</sup>, I. G.; Rodrigues<sup>2</sup>, I. C. B.; Leão<sup>2</sup>, V. A. e Dias<sup>3</sup>, S. C.

<sup>1</sup> Universidade Federal de São João del Rei, Departamento de Engenharia Química

<sup>2</sup> Universidade Federal de Ouro Preto, Programa de pós-graduação em Engenharia Ambiental

<sup>3</sup> Universidade Federal de São João del Rei, Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos

E-mail: isabelcbraga@ufs.edu.br

### 1. Introdução

O desenvolvimento industrial e o aumento da capacidade produtiva estão diretamente relacionados ao volume produzido de rejeitos nocivos ao meio ambiente (COSTA, 2008), sendo imprescindível as buscas por tecnologias viáveis para o tratamento adequado desses rejeitos.

As Células de Energia Microbianas (CEMs) são uma tecnologia promissora para o tratamento de efluentes, pois aliam a recuperação de energia elétrica à remoção dos poluentes a partir do metabolismo microbiano, com funcionamento similar a uma pilha eletroquímica (ISOSAARI e SILLANPÄÄ, 2017). No interior das CEMs a oxidação da matéria orgânica por microrganismos libera elétrons e organismos exoeletrogênicos são capazes de utilizar a superfície sólida do anodo comoceptor de elétrons. Os elétrons transferidos para o anodo percorrem um circuito externo e são destinados a um receptor final na câmara catódica, gerando, uma diferença de potencial (ZHOU et al., 2013).

O íon sulfato é incorporado em efluentes de diversos processos industriais, como galvanoplastia, na indústria de papel e celulose, mineração/metallurgia, dentre outros (SARTI et al., 2008). A presença de sulfato na água pode afetar a saúde humana e de animais. Além disso, sob condições adequadas, o sulfato pode ser biologicamente reduzido a sulfeto, gás tóxico que causa problemas associados ao odor e à corrosão. Efluentes

contendo altas cargas de sulfato, aumentam a acidez dos corpos de água afetando os ecossistemas aquáticos (ZHOU et al., 2013).

O tratamento biológico de efluentes contendo sulfato utilizando bactérias redutoras de sulfato (BRS) já é bem estabelecido, pois estes microrganismos utilizam este ânion comoceptor final de elétrons, gerando H<sub>2</sub>S como produto (BERTOLINO et al., 2012). Foi sugerido que BRS têm natureza eletroativa (ZHOU et al., 2013) sendo adequado seu estudo em sistemas bioeletroquímicos.

Nesses sistemas, membranas permeáveis mantêm o equilíbrio entre as câmaras anódica e catódica, pois permitem o fluxo de íons entre os compartimentos e, ainda, os separa fisicamente. Estes separadores podem ter interferência direta na produção de energia aumentando ou reduzindo a resistência interna dos sistemas. Além disso, estas membranas podem aumentar o custo de construção das CEMs (LOMONACO, 2015).

A grande maioria dos estudos em escala laboratorial concentra-se na utilização de membranas trocadoras de prótons (por exemplo, Nafion®), no entanto, este tipo de material tem um custo significativo para o desenvolvimento destes sistemas em escala real (SANTORO et al., 2017). Algumas alternativas são relatadas como fibras de náilon, fibras de vidro, cerâmica ou ainda membranas de microfiltração (ARAÚJO, 2015).

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo o estudo da remoção de DQO e  $\text{SO}_4^{2-}$  em células de energia microbiana avaliando o uso de diferentes membranas separadoras de baixo custo.

## 2. Material e Métodos

Os reatores foram montados com cilindros de PVC soldáveis de 40 mm de diâmetro e o comprimento final dos mesmos foi de 210 mm. Os eletrodos de bastão de grafite (9,6 mm de espessura e 55 mm de altura) foram posicionados paralelamente às membranas separadoras. Os contatos elétricos foram feitos por fios de cobre de 1,5 mm e o circuito externo foi fechado por resistor de 10 k $\Omega$ .

Foram testadas como membranas separadoras entre as câmaras membrana de microfiltração (nitrocelulose 0,22  $\mu\text{m}$ ); placa de ágar de 5 mm de espessura; látex e foi feito um experimento controle sem membrana.

O meio de cultivo foi o meio Postgate C modificado, como descrito por Bertolino et al., 2012, no entanto, utilizando a lactose como fonte de carbono. A concentração teórica inicial de DQO foi de 4000  $\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1}$  e a de sulfato foi de 2000  $\text{mg L}^{-1}$ .

A câmara anódica foi preenchida com 50g de carvão ativado granular. Foram adicionados 130 mL de meio de cultivo e 20 mL de um inóculo enriquecido em BRS obtido de um reator UASB de escala laboratorial. As células foram incubadas a 32°C. Ao final de 30 dias foram retirados 100 mL de meio das células e repostos meio novo (final da fase I e início da fase II), sem haver nova inoculação. A fase II também teve duração de 30 dias.

O potencial das CEM foi medido utilizando um multímetro digital (Klein Tools). Ao final de cada ciclo de alimentação das CEM foi determinada a DQO e a concentração de sulfato residuais. A DQO foi medida pelo método da oxidação pelo dicromato de potássio em solução ácida (APHA, 1998). A concentração de sulfato foi determinada por Espectrofotometria de

Emissão Atômica com fonte de Plasma (ICP/OES).

## 3. Resultados e discussão

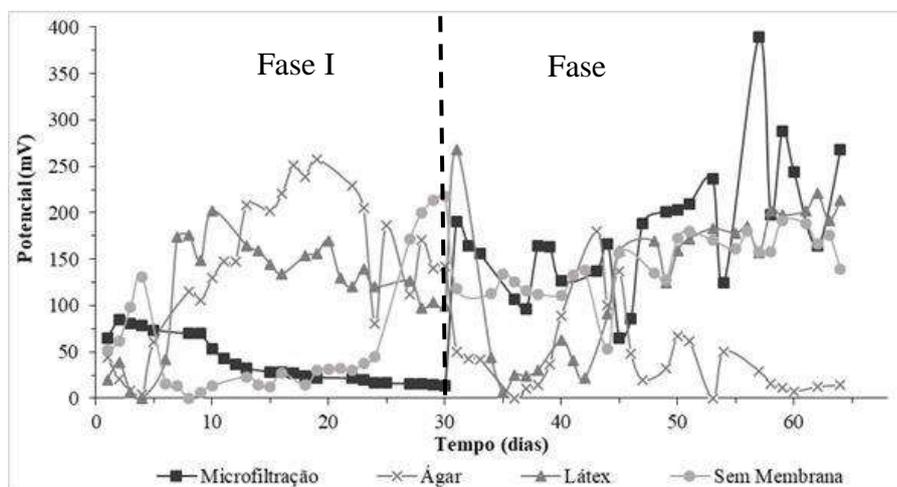
A figura 1 mostra a variação de potencial com o tempo para as células construídas com diferentes membranas (microfiltração; ágar; látex e sem membrana). Nota-se que nos dez primeiros dias de cada fase há grande variação nas medidas de potencial, supondo que seja esse o tempo necessário para que os reatores entrem em *steady state* (ARAÚJO, 2015). Dessa forma, a média do potencial elétrico gerado foi feita a partir das medidas do dia 10 ao 30 para a fase I e do dia 40 ao 60 na fase II (Tabela 1).

De acordo com a figura 1 a célula construída com membrana de ágar apresentou melhor desempenho na fase I, atingindo potencial máximo de 258 mV, no entanto, a célula construída com membrana de látex mostrou geração de potencial mais estável. Na fase II, o melhor desempenho foi para a membrana de microfiltração com um pico de potencial de 389 mV, mais uma vez a membrana de látex tende a estabilizar o potencial a partir do 45º dia. Uma membrana ideal deve facilitar a transferência de prótons da câmara anódica para a catódica, pois, para obter uma corrente consistente, para cada elétron produzido, um próton equivalente deve ser transportado para o catodo através do eletrólito (AYYARU e DHARMALINGAM, 2011). Em vista do exposto, a membrana de látex parece oferecer esta característica de forma mais eficiente que as demais. A literatura ainda não relata a utilização desse material como separador em CEM para que melhores comparações sejam efetuadas.

A tabela 1 mostra que os percentuais de remoção de DQO situaram-se acima de 60%, com valores inclusive acima dos 70% típicos para reatores anaeróbios (CHERNICHARO, 1997). Para remoção de sulfato foram atingidos valores da ordem de 90% na fase II. Barbosa et al. (2014) relatam que em sistemas em batelada as remoções máximas de sulfato,

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

para uma relação  $DQO/SO_4^{-2}$  igual a 2, são de 60%.



**Figura 1:** Variação do potencial (mV) com o tempo para CEMs construídas com membrana de microfiltração, ágar, látex e sem membrana.

**Tabela 1:** Porcentual de remoção de DQO e sulfato e potencial médio para as fases I e II de CEMs construídas com membrana de microfiltração, ágar, látex e sem membrana.

CEM	Fase I			Fase II		
	Remoção de DQO (%)	Remoção de SO <sub>4</sub> (%)	Potencial médio (mV)	Remoção de DQO (%)	Remoção de SO <sub>4</sub> (%)	Potencial médio (mV)
<b>Microfiltração</b>	71±1	89±1	32±21	62±1	89±1	194±79
<b>Ágar</b>	92±1	16±1	184±52	80±1	31±7	20±15
<b>Látex</b>	95±1	56±1	139±28	71±2	96±1	154±59
<b>Sem membrana</b>	84±1	60±1	70±79	71±3	92±1	152±33

Ainda de acordo com os valores apresentados na tabela 1, na primeira fase, a maior produção de energia esteve correlacionada às maiores remoções de DQO. Já na segunda fase, as maiores produções de energia foram correlacionadas a maior remoção de sulfato. Observa-se nos primeiros dias de experimento grande produção de gás nos reatores oriundo de processos fermentativos, dessa forma, supõe-se que a maior remoção de DQO correlacionada à maior produção de energia na fase I seja devida à seleção de microrganismos fermentadores e eletrogênicos não redutores de sulfato. Kumar et al. (2017) foram os únicos que estudaram o mutualismo

filogenético da comunidade microbiana do anodo em função dos metabólitos liberados no eletrólito. As análises mostraram que a transferência de elétrons estava associada a todos os micro-organismos do consórcio, desde micro-organismos fermentativos, a redutoras de sulfato e bactérias oxidantes de sulfeto. Houve associação sinérgica entre as espécies tanto para geração de bioeletricidade, quanto para degradação de matéria orgânica.

Além disso, BRS não são capazes de utilizar a lactose como fonte direta de energia, logo, após fermentação da mesma seriam liberados monômeros que serão consumidos por este grupo de microrganismos

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

(BERTOLINO et al., 2012), justificando um crescimento tardio dos mesmos.

Com o passar do tempo, o acúmulo de sulfeto gerado pela redução de sulfato, contribui para a geração de energia devido à sua oxidação à enxofre por microrganismos oxidantes de sulfeto presentes no consórcio de microrganismos do reator, fazendo com que a maior produção de energia seja associada à maior remoção de sulfato. No trabalho de Chou et al. (2013) utilizando CEM inoculadas com cultura mista de BRS e lactato como fonte de carbono, os percentuais de remoção de DQO foram da ordem de 90%, mas a remoção de  $\text{SO}_4^{2-}$  não ultrapassou 60%. Os autores relatam que a produção de corrente era resultante da oxidação do sulfeto (oriundo da redução de sulfato) e também da oxidação do lactato por microrganismos exoeletrogênicos.

Quanto ao desempenho das membranas, na primeira fase o melhor desempenho foi para a membrana de látex, uma vez que houve maior remoção tanto de DQO quanto de  $\text{SO}_4^{2-}$  com considerável produção de energia. Na segunda fase este mesmo comportamento se repetiu para a membrana de látex e também para a célula controle sem membrana.

#### 4. Conclusão

Este trabalho mostrou que é possível alcançar altas remoções de DQO em um sistema anaeróbio e também altas remoções de sulfato (ambas da ordem de 90%) e ainda recuperar energia elétrica em células de energia microbiana, utilizando látex como membrana separadora, um material acessível e de baixo custo, corroborando para a ciência no sentido de viabilizar a aplicação dessa tecnologia em maiores escalas.

#### 5. Agradecimentos

À Fapemig, CNPq e CAPES pelo financiamento e apoio à pesquisa. À UFSJ pelo espaço e equipamentos e à UFOP pelas análises químicas.

#### 6. Referências

- ARAÚJO, K. C. D. Construção e Otimização de Sistemas Bioeletroquímicos para utilização no tratamento de efluentes de alta carga fermentescível. 2015. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós Graduação em Tecnologias para Desenvolvimento Sustentável, Universidade Federal de São João Del Rei, Ouro Branco.
- APHA. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20ed. Washington, D.C. (USA): American Public Health Association, 1998. 1325 p.
- AYYARU, S. e DHARMALINGAM, S. Development of MFC using sulphonated polyether ether ketone (SPEEK) membrane for electricity generation from waste water. *Bioresource Technology*, v.102, n.24, p.11167-71. 2011.
- BERTOLINO, S. M., et al. Implications of volatile fatty acid profile on the metabolic pathway during continuous sulfate reduction. *Journal of Environmental Management*, v.103, p.15-23. 2012.
- COSTA, A. M. G. Desempenho de filtro anaeróbio no tratamento de efluente formulado com diferentes concentrações de soro de queijo. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008, 76f.
- CHERNICHARO, C. A. L. *Reatores Anaeróbios. Princípios de Tratamento Biológico de Águas Residuárias*. Belo Horizonte - MG: Editora da UFMG. 1997. 246 p.
- CHOU, T. Y., et al. Control of dual-chambered microbial fuel cell by anodic potential: Implications with sulfate reducing bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.38, n.35, p.15580-15589. 2013.
- ISOSAARI, P. e SILLANPÄÄ, M. Use of Sulfate-Reducing and Bioelectrochemical Reactors for Metal Recovery from Mine Water. *Separation & Purification Reviews*, v.46, n.1, p.1-20. 2017.
- KUMAR, S. S., et al. Syntrophic association and performance of *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Aeromonas* and *Tetrathlobacter* as anodic biocatalysts for bioelectricity generation in dual chamber microbial fuel cell. *Environmental Science and Pollution Research*, v.24, n.19, p.16019-16030. 2017.
- LOMONACO, O. A. V. *Células combustíveis microbianas, uma possibilidade de geração de energia elétrica a partir de águas residuárias e matéria orgânica*. Trabalho de conclusão de curso - Universidade de São Paulo, Lorena, 2015, 60f.
- SANTORO, C., et al. Microbial fuel cells: From fundamentals to applications. A review. *Journal of Power Sources*, v.356, p.225-244. 2017.
- SARTI, A., et al. Remoção de sulfato de águas residuárias industriais em reator anaeróbio de leito fixo operado em bateladas sequenciais. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, v. 13, p. 15-22, 2008.



## II SIMPÓSIO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA



Universidade Federal  
de São João del-Rei

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

---

ZHOU, M., et al. *Recent advances in microbial fuel cells (MFCs) and microbial electrolysis cells (MECs) for wastewater treatment, bioenergy and bioproducts.* **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 2013, v. 88, n. 4, p. 508-518.

## EXTRAÇÃO DE QUITINA A PARTIR DA BIOMASSA SECA DO FUNGO *Cladosporium sp*

Ferreira<sup>1</sup>, L. C.; Oliveira Junior<sup>2</sup>, E. N.

<sup>1</sup>Universidade Federal de São João Del-Rei *Campus* Alto Paraopeba, Engenharia de Bioprocessos

<sup>2</sup>Universidade Federal de São João Del-Rei *Campus* Alto Paraopeba, Departamento de Química Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos/Engenharia de Bioprocessos

E-mail: ludmilaferreiraeb@gmail.com

### 1. Introdução

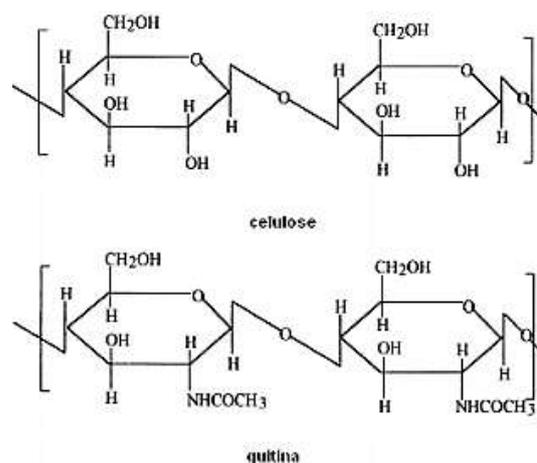
A quitina é um importante biopolímero de aplicação industrial, tais como, alimentícias, farmacêuticas, biomédicas, cosméticas e recentemente até na terapia genica (FARIA, 2015).

Foi originalmente chamada de *fungina* quando descoberta em cogumelos pelo professor francês Henri Braconnot, em 1811. Em seu trabalho, o professor afirmou que o material continha uma nova substância que era completamente diferente da encontrada nas madeiras (FONSECA, 2016). Mas somente doze anos depois, em 1823, que Odier isolou uma substância insolúvel contida nas carapaças dos insetos utilizando KOH (hidróxido de potássio) quente. Embora tenha falhado em não detectar nitrogênio na sua composição, foi o primeiro a relatar a semelhança entre as substâncias presentes na armadura dos insetos e nos tecidos vegetais (ANTONINO, 2007). Em 1843 que houve a descoberta de que a quitina continha nitrogênio em sua estrutura por Payen (FARIA, 2015).

A constituição da quitina é basicamente unidades de N-acetil-D-glicosamina e D-

glicosamina unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) (LOPES *et al.*, 2017).

A quitina possui estrutura semelhante a fibra de celulose, a diferença molecular entre ambas está relacionada aos grupos hidroxila presentes na celulose que na quitina foram substituídos por grupos acetoamida (DIAS *et al.*, 2013) *Figural*.



**Figura 1:** Estrutura dos biopolímeros celulose, quitina (Adaptado AZEVEDO *et al.*, 2007)

A quitina é o segundo composto orgânico mais importante e abundante da natureza depois da celulose e esta presente no exoesqueletos dos

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

insetos, crustáceos e na parede celular dos fungos (FONSECA, 2016).

Na atualidade, a fonte de quitina mais utilizada tem sido a carapaça de crustáceos e o exoesqueleto de insetos e crustáceos (FRANCO *et al.*, 2004), porém, estudos envolvendo fungos como fonte alternativa para obtenção de quitina tem mostrado resultados bastante eficientes (ANTONINO, 2007)

A composição química da parede celular dos fungos é extremamente complexa, mas sabe-se que entre os compostos mais frequentes tem-se quitina, glucanas, e proteínas (ADAMS, 2004).

Os fungos característicos do gênero *Cladosporium* spp são denominados fungos demácios, mielinizados ou pretos por apresentarem coloração naturalmente escura, consequência da presença de pigmento melânico (di-hidroxinaftalenomelanina) em sua parede celular (MENEZES *et al.*, 2017).

O gênero *Cladosporium* spp se destaca compreendendo um número de superior a 189 espécies, ficando entre os fungos mais comumente isolados do ambiente, podendo ser isolado a partir de praticamente qualquer fonte ambiental e localização geográfica (MENEZES *et al.*, 2017).

Industrialmente, a quitina é extraída por um tratamento ácido para dissolver o carbonato, seguida de uma extração alcalina para solubilizar as proteínas. A despigmentação é realizada para obtenção de um produto incolor. A quitina resultante deve ser classificada em termos de pureza e cor, assim resíduos de proteínas podem inviabilizar aplicações biomédicas por exemplo (FERNANDES, 2009).

Neste contexto, o objetivo do trabalho foi a obtenção de quitina a partir da biomassa seca do fungo *Cladosporium* sp.

## 2. Material e Métodos

A biomassa seca do fungo *Cladosporium* sp. utilizada neste estudo foi obtida por Diniz *et al.* (2016), que realizou os testes de identificação do fungo, bem como a caracterização do fungo por microscopia eletrônica de varredura.

O processo de purificação da quitina foi realizado de acordo com metodologia proposta por Synowiecki e Al-Khateeb (1997), com algumas modificações. Iniciou-se com a desproteínização, nesta etapa, transferiu-se uma solução previamente preparada a 2% de KOH (hidróxido potássio) (30:1) para um balão volumétrico juntamente com 8,33g da amostra fungica, onde a solução ficou à 90°C por um período de 2 horas sobre agitação magnética constante. Após, centrifugou-se a amostra a 5.550 rpm e realizou-se sucessivas lavagens com água destilada até que alcançou-se pH igual a 7,0.

Em seguida, realizou o processo de desmineralização ácida. Preparou-se uma solução 10% (v/v) de ácido acético (40:1  $\frac{v}{w}$  (ácido:biomassa). O processo ocorreu a 60°C por um período de 6 horas. Em seguida, centrifugou-se durante 15 minutos a 5550 rpm e lavou-se a amostra (*pellet*) com água até que alcançou-se pH igual a 7,0. Em seguida, preparou-se uma solução de etanol (10:1  $\frac{v}{w}$  e lavou-se a amostra três vezes. Também, lavou-se com uma solução de acetona (10:1  $\frac{v}{w}$  duas vezes e secou-se a amostra em estufa a 60°C.

Para a despigmentação (A<sub>1</sub>) preparou-se uma solução etanol/acetona (1:1) e adicionou-se 0,5g de amostra a temperatura ambiente e agitação constante por um período de 1 hora. O material sólido foi centrifugado, filtrado e, em seguida, seco em estufa à 40°C por 12 horas. Outra técnica de despigmentação (A<sub>2</sub>) foi aplicada, nesta, adicionou-se 0,5g de amostra a

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

30 mL de hipoclorito de sódio a 2% à temperatura de 40°C e agitação constante durante 12 horas. O material sólido foi filtrado e seco em estufa à 40°C por 12 horas.

Para caracterização da amostra utilizou-se a técnica de espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) onde a amostra seca foi submetida à determinação espectroscópica na região do infravermelho (4000-500cm<sup>-1</sup>).

### 3. Resultados e Discussões

No presente trabalho, a biomassa fúngica foi inicialmente desproteïnizada, etapa em que a principal função é reduzir o teor de nitrogênio protéico, seguido do processo de desmineralização ácida. A redução percentual em massa da biomassa fúngica, após o tratamento alcalino (desprotenização) e tratamento ácido (desmineralização) foi de aproximadamente 15% (m/m), estando de acordo com Synowiecki e Al-Khateeb (1997), que sugerem teores de proteína em fungos filamentosos de 10 a 15% (m/m).

No primeiro método de despigmentação A<sub>1</sub> não houve mudanças consideráveis de cor do material por análise visual. Visando melhorar este processo de remoção de cor, realizou-se a despigmentação A<sub>2</sub>, o que resultou em uma melhora na despigmentação e remoção parcial do pigmento. Tal feito, pode estar relacionado ao aquecimento da solução, que promoveu catalise da reação.

Uma hipótese à adequação do problema pode ser o uso de solventes apolares como hexano, benzeno e clorofórmio, uma vez que todos os solventes utilizados na metodologia apresentam comportamento polar. A implementação de um equipamento Soxhlet no procedimento também pode ser um fator

interessante a ser considerado, em virtude da preservação do amostra.

Os espectros obtidos da amostra parcialmente despigmentada (Figura 2), revelam uma banda mais larga e intensa entre os número de onda de 3500 e 3000 cm<sup>-1</sup> que corresponde ao alongamento O-H presente na quitina, e também uma pequena banda na região de 2900 a 3000 cm<sup>-1</sup> atribuídas ao estiramento C-H. Outras bandas fortes são observadas entre 1750 cm<sup>-1</sup> e 1200 cm<sup>-1</sup>. Todos grupos funcionais encontrados nos resultados de FTIR da amostra são característicos da quitina e estão de acordo com Souza *et al.*, (2015).

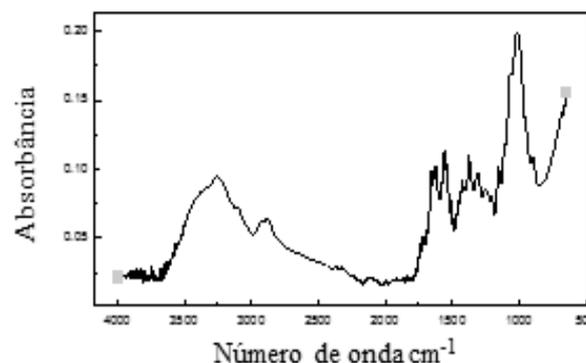


Figura 2: Espectro de quitina (O autor.)

### 4. Considerações Finais

Após análises dos dados, pode-se concluir que a metodologia de extração de quitina foi eficiente e que a biomassa fungica do *Cladosporium* sp é uma excelente fonte para extração de quitina devido sua vasta disponibilidade no meio ambiente. Entretanto, uma nova metodologia de despigmentação será utilizada para se obter uma quitina de maior pureza.

### 5. Referências Bibliográfica

ANTONINO, N. A **Otimização do Processo**



## II SIMPÓSIO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA



Universidade Federal de São João del-Rei

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

**de Obtenção de Quitina e Quitosana de Exoesqueletos de Camarões Oriundos da Indústria Pesqueira Paraibana.** 2007. 89f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2007.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES S. A.; BEZERRA D. C.; LIA FOOK, M. V.; M.Costa1 A. C. F. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.2, n.3, p.27-34, dez. 2007. ISSN 1809-8797. Disponível em: <http://www2.ufcg.edu.br/revista-remap/index.php/REMAP/article/viewFile/46/81>. Acesso 29 Ago. 2019.

FARIA, P. F., **Produção e Caracterização de Filmes De Quitosana de Amostras Comerciais e Modificadas Enzimaticamente.** 2015. 78f. Dissertação (Mestrado em Tecnologias para o Desenvolvimento Sustentável) - *Campus Alto Paraopeba*, Universidade Federal de São João Del-Rei, Ouro Branco. 2015.

FERNANDES, L. L. **Produção e Caracterização de Membranas de quitosana com sulfato de condroitina para aplicações biomédicas.** 2009. 63f. Monografia - Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2009.

FRANCO, L. O.; MAIA, R. C. C., PORTO, A.L.F., MESSIAS, A.S., FUKUSHIMA, K., CAMPOSTAKAKI, G.M., Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans*. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 35, n. 3, p. 243-247. 2004.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

MENEZES, P. C., PEREZ, L. A. L. A., OLIVEIRA, L. E., *Cladosporium* spp: Morfologia, infecções e espécies patogênicas. **Acta Brasiliensis**. v. 1, n. 1, p. 23-27, jan. 2017. ISSN 2526-4338. Disponível em: <<http://revistas.ufcg.edu.br/ActaBra/index.php/actabra/article/view/6>>. Acesso em: 29 ago. 2019. doi:<https://doi.org/10.22571/Actabra1120176>.

SOUZA, M. F., FERREIRA, S. M, R., BARBOSA, C. R., Utilização da Casca de Camarão para Produção de Quitina. **Revista Acadêmico-Científica**. v.7, n.1, Março de 2015. ISSN 2317-661X. Disponível em: [http://www.revistascire.com.br/artigo/2015/MAR%C3%87O/UtilizacaoCascaCamarao\\_Fernanda\\_Menezes.pdf](http://www.revistascire.com.br/artigo/2015/MAR%C3%87O/UtilizacaoCascaCamarao_Fernanda_Menezes.pdf). Acesso: 29 Ago. 2019.

SYNOWIECKI, J., AL-KHATEEB, N. A. A. Q. 1997. Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and Chitosan Food Chemistry. **Elsevier Science Ltd** v. 60, n. 4, p. 60-610. Dezembro de 1977. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814697000393>. Acesso: 29 Ago. 2019. doi. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00039-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00039-3).

### 6 – Agradecimentos

CAPES, CNPQ e FAPEMIG

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

## O POTENCIAL ANTIFÚNGICO DOS EXTRATOS VEGETAIS ETANÓLICOS E ACÉTICOS DE *Mentha piperita* E *Rosmarinus officinalis* CONTRA O FITOPATÓGENO *Rhizopus oryzae*

Abreu, T. K.<sup>1</sup>; Peixoto, V. R. C.<sup>2</sup> e Oliveira Jr, E. N.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de São João del Rei, Engenharia Química

<sup>2</sup> Universidade Federal de São João del Rei, Engenharia de Bioprocessos

<sup>3</sup> Universidade Federal de São João del Rei, Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos

E-mail: eniobio@ufsj.com

### 1. Introdução

A população mundial vem aumentando continuamente, assim como a preocupação em relação à quantidade e qualidade dos alimentos produzidos. A utilização de plantas com atividade fungicida vem sendo pesquisada amplamente, visto que a sociedade está buscando consumir produtos que utilizem o mínimo possível de substâncias sintéticas para o controle de moléstias. O potencial de extratos no controle de fitopatógenos se deve à sua ação fungitóxica, a qual é responsável pela inibição do crescimento micelial (CARVALHO, 2009).

Uma vez que o manejo e o surgimento de patógenos resistentes têm reduzido a estratégia de controle à base de fungicidas, tem-se a retirada dos registros de muitos produtos do mercado (JOHNSON E SANGHOTE, 1994). Assim, surge a necessidade de desenvolver métodos alternativos de controle que não comprometam a qualidade dos frutos e a saúde humana (PLETSCH, 1998).

Neste trabalho testou-se a ação dos extratos acéticos e etanólicos de *Mentha piperita* (Menta) e *Rosmarinus officinalis* (Alecrim) contra o fitopatógeno *Rhizopus oryzae* que infesta um grande número de plantas invadindo os tecidos por meio de fermentos.

### 2. Metodologia

Primeiro realizou-se a extração de dois solventes com o intuito de compará-los, para isso foi necessário pesar um total de 15g de cada erva e triturá-las de forma uniforme. Em seguida dividiu-se a porção de cada erva para diluir uma em 25mL de ácido acético 40% e outra em 25mL de etanol 40%, totalizando 4 porções. Decorrido 15 dias de armazenamento montou-se um sistema de filtração simples obtendo-se os quatro extratos etanólicos e acéticos de *Rosmarinus officinalis* e *Mentha piperita*.

Em seguida preparou-se o meio, com materiais autoclavados, composto de 4,5g de Sabouraud Dextrose Broth, homogeneizado em 150mL de água.

Após a preparação do meio realizou-se o teste de bioensaio, foram utilizadas 2 placas de 96 poços de polietireno. Na primeira placa foi testado o crescimento do fungo *Rhizopus oryzae*, em que na linha A, B e C, havia o extrato de *Rosmarinus officinalis* com ácido acético, e nas linhas E, F e G, havia extrato de *Rosmarinus officinalis* com etanol. Na segunda placa foi testado o crescimento do fungo *Rhizopus oryzae*, em que na linha A, B e C, havia o extrato de *Mentha piperita* com ácido acético, e nas linhas E, F e G, havia extrato de *Mentha piperita* com etanol. Em todas as placas a linha D e H, não obtiveram a adição de esporos, sendo, portanto, o branco.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

As concentrações adicionadas de cada solução, distribuídas em 12 colunas, foram as mesmas seguindo o procedimento geral totalizando 200 $\mu$ L em cada poço, adicionando-se os componentes seguindo a ordem de: água destilada (de 75 $\mu$ L a 0  $\mu$ L); meio Sabouraud (115 $\mu$ L em todos); extrato (0 $\mu$ L a 75 $\mu$ L); esporo (10 $\mu$ L em todos).

Após preparação das 2 placas, incubou-se à 25°C sob agitação de 180 rpm em um shaker, durante os 8 dias de análise. Monitorou-se a cada 24h, utilizando um leitor de microplacas a um comprimento de onda de 405nm.

Os dados recolhidos foram analisados com auxílio de gráficos gerados pelo Software Oringi 8.

Realizou-se a medição do pH dos quatro extratos. Após a realização das leituras das placas de 96 poços, alíquotas de 20 $\mu$ L do sobrenadante das cavidades onde foi observada completa inibição do crescimento fúngico nas placas de microdiluição foram semeadas em placas de petri com meio sabouraud. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por 7 dias. O crescimento significa o efeito fungistático e o não crescimento o efeito fungicida, segundo classificação da EMBRAPA.

### 3. Resultados e Discussões

Foram feitos gráficos mostrando a cinética de crescimento dos fungos na presença dos extratos acético e etanólicos de *Rosmarinus officinalis* e *Mentha piperita* com volumes variando de 0 $\mu$ L, que é o controle, até 75 $\mu$ L durante o período de 8 dias de monitoramento, feito a partir da medição das absorbâncias a 405nm.

Na Figura 1 é mostrada a cinética de crescimento do fungo *Rhizopus oryzae* na presença do extrato acético de *Rosmarinus officinalis*.

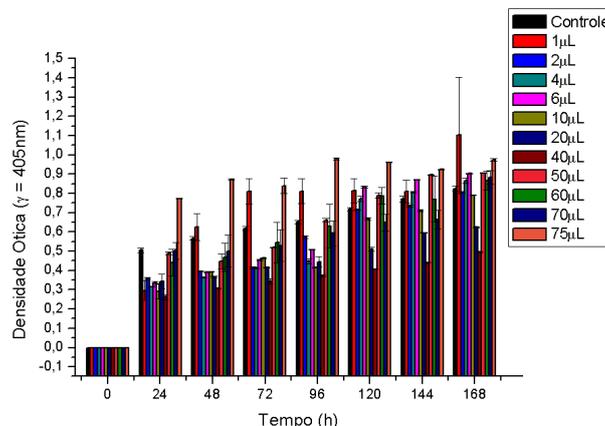


Figura 1: Monitoramento da cinética de crescimento do fungo *Rhizopus oryzae* por absorbância a 405nm sem adição do extrato acético de *Rosmarinus officinalis* e em concentrações diferentes do extrato a 25°C e agitação de 180 rpm durante 8 dias.

Na Figura 2 é mostrada a cinética de crescimento do fungo *Rhizopus oryzae* na presença do extrato acético de *Mentha piperita*.

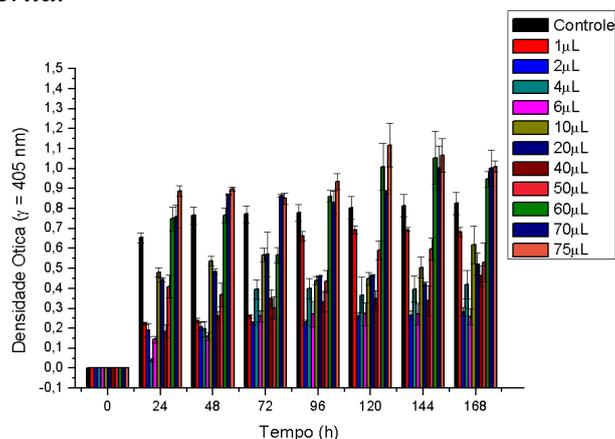


Figura 1: Monitoramento da cinética de crescimento do fungo *Rhizopus oryzae* por absorbância a 405nm sem adição do extrato acético de *Mentha piperita* e em concentrações diferentes do extrato a 25°C e agitação de 180 rpm durante 8 dias.

A partir das Figuras 1 e 2 observou-se que com o aumento do volume dos extratos acéticos de *Rosmarinus officinalis* e de *Mentha piperita* houve um aumento significativo da presença *Rhizopus oryzae* sendo que quanto maior o volume do extrato mais propício ficou para o crescimento do fungo. Assim constatou-se que com ambos os extratos não há inibição da atividade fúngica com nenhum dos volumes estudados.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

Atribuímos este fato ao ensaio do pH, em que os ambos os extratos acéticos tinham pH na faixa de 3, sendo assim no experimento feito propiciamos as condições que favoreceram o crescimento dos fungos, onde eles previamente cresceram em um meio levemente ácido (pH 5,6) e posteriormente foram expostos a pH de valores mais baixos. Essa condição é denominada Adaptive Tolerance Response (ATR), em que microrganismos que crescem em condições levemente ácidas e depois são expostos a valores mais baixos de pH apresentam sobrevivência significativamente maior do que se fossem previamente crescidos em condições ótimas (O'HARA *et al.*, 1989).

Na Figura 3 é mostrada a cinética de crescimento do fungo *Rhizopus oryzae* na presença do extrato etanólico de *Rosmarinus officinalis*.

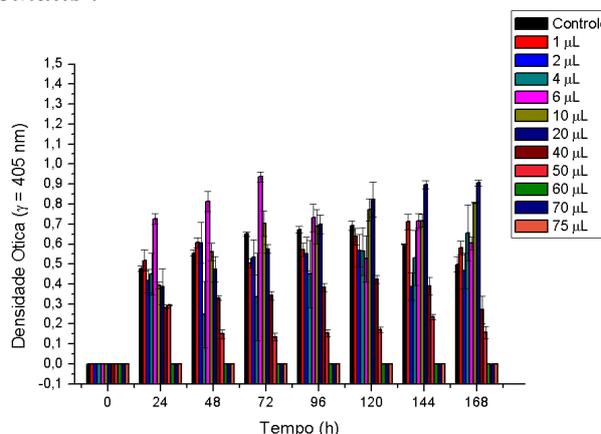


Figura 3: Monitoramento da cinética de crescimento do fungo *Rhizopus oryzae* por absorvância a 405nm sem adição do extrato etanólico de *Rosmarinus officinalis* e em concentrações diferentes do extrato a 25°C e agitação de 180 rpm durante 8 dias.

A Figura 3 nos mostra que entre 0µL à 50µL houve um crescimento não linear dos fungos em relação a concentração de extrato, apenas a partir da concentração de 60µL não houve crescimento do fungo durante o período de 168h, sendo esse portanto o volume mínimo inibitório, para de fato impedir o crescimento do fungo *Rhizopus oryzae* com o extrato etanólico de *Rosmarinus officinalis*.

Os dados foram submetidos à análise de variância comparando-se as médias pelo teste

de Tukey a 5% de probabilidade que demonstrou que não há mudança notória ao adicionar os volumes de 0µL à 50µL, sendo assim, o fungo não percebe o efeito do extrato dentro deste intervalo de concentração, independente de qual seja o volume adicionado. Apenas quando o volume é superior a 60µL que de fato há distinção na cinética de crescimento dos fungos. Também não há diferença entre os volumes adicionados entre 60µL a 75µL, portanto o valor de 60µL é o mínimo eficaz para acarretar a inibição do fungo *Rhizopus oryzae* com o extrato etanólico de *Rosmarinus officinalis*.

Na Figura 4 é mostrada a cinética de crescimento do fungo *Rhizopus oryzae* na presença do extrato etanólico de *Mentha piperita*.

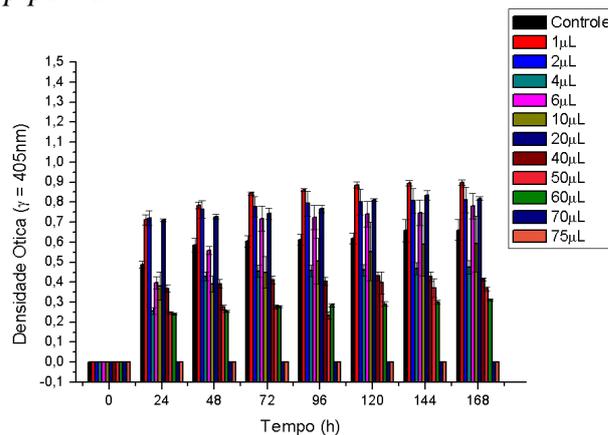


Figura 4: Monitoramento da cinética de crescimento do fungo *Rhizopus oryzae* por absorvância a 405nm sem adição do extrato etanólico de *Mentha piperita* e em concentrações diferentes do extrato a 25°C e agitação de 180 rpm durante 8 dias.

A partir da Figura 3 é possível analisar que houve um crescimento dos fungos não linear à concentração de extrato entre os volumes de 0µL à 60µL, apenas a partir da concentração de 70µL não houve crescimento do fungo durante o período de 8 dias, sendo esse o volume mínimo inibitório para impedir o crescimento do fungo *Rhizopus oryzae* com o extrato etanólico de *Mentha piperita*.

Realizou-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade que informou que não há mudança notória ao adicionar os volumes de 0µL à 60µL. Apenas quando o volume é

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

superior a 70µL que há distinção na cinética de crescimento dos fungos. Também não há diferença entre os volumes adicionados entre 70µL à 75µL, portanto o valor de 70µL é o mínimo eficaz.

O teste de pH realizado com os extratos etanólicos apresentou um pH na faixa de 5,3, sendo também um pH ácido, mas que não proporcionou um ambiente de proliferação dos fungos como ocorreu com os extratos acéticos.

Caso o extrato apresente efeitos biológicos de interesse, o solvente mais adequado para obtenção do extrato bruto é o etanol ou metanol, pois possibilita a extração de um maior número de compostos (CECHINEL *et al.*, 1998), sendo que combinados com o *Rosmarinus officinalis*, que apresenta ação de antibiótico, anti-inflamatório, anti-oxidante e antiparasitário (ALONSO, 1998), e a *Mentha piperita*, que apresenta características antisséptica, antiviral, antibacteriana, antifúngica, analgésica e antioxidante (BATISTUZO, 2011), apresentaram o resultado positivo na inibição.

A avaliação da ação fungicida ou fungistática comprovou que a ação do extrato etanólico sobre os fungos é fungistática, de acordo com a classificação da EMBRAPA. Sendo assim, há apenas uma inibição do crescimento dos fungo *Rhizopus oryzae* no ambiente que proporcionamos, mas quando alocados em ambientes favoráveis há germinação dos esporos.

#### 4. Considerações Finais

Os extratos etanólicos demonstraram grande eficiência na inibição do crescimento dos fungos *Rhizopus oryzae* e *Penicillium citrinum*, onde o extrato etanólico de *Rosmarinus officinalis* teve volume inibitório mínimo de 60µL e o extrato etanólico *Mentha piperita* teve volume inibitório de 70µL. Foi possível constatar que os extratos tiveram um efeito fungistático sobre os fungos estudados. Por outro lado os extratos acéticos não demonstraram eficácia no controle do crescimento dos fitopatógenos

estudados, não sendo viável sua utilização para este fim.

Portanto os extratos etanólicos de *Rosmarinus officinalis* e *Mentha piperita* mostraram-se como uma alternativa ao uso de fungicidas químicos no tratamento contra os fungos *Rhizopus oryzae* e *Penicillium citrinum*, sendo eficientes na inibição do crescimento fúngico e uma alternativa não tóxica, natural, de fonte renovável e abundante que poderia ser utilizada no controle de doenças causadas pelos fungos estudados neste trabalho.

#### 5. Revisão Bibliográfica

- ALONSO, J. R. Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas. Buenos Aires: Isis Ediciones S.R.L., 1998. 1039 p.
- BATISTUZO, J. A. O. et al. Formulário Médico Farmacêutico. 4ª ed. São Paulo: Pharmabooks editora, 2011.
- CARVALHO, P. Obtenção de extratos vegetais por diferentes métodos de extração: estudo experimental e simulação dos processos. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 2009. 143 f.
- CECHIENEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais, conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. QUÍMICA NOVA, 21(1), 1998.
- EMBRAPA. FUNGICIDAS I: UTILIZAÇÃO NO CONTROLE QUÍMICO DE DOENÇAS E SUA AÇÃO CONTRA OS FITOPATÓGENOS. Ministério da Agricultura e do Abastecimento – 1999.
- JOHNSON, G.I.; SANGHOTE, S. Control postharvest disease of tropical fruits challenges for the 21st century. In: POSTHARVEST HANDLING OF TROPICAL FRUITS, 1994, Austrália. Proceedin. Austrália, 1994. p. 140-161.
- O'HARA, G.W.; GOSS, T.J. DILWORTH, M.J. & GLENN, A.R. Maintenance of intracellular pH and acid tolerance in rhizobium meliloti. Appl. Environ. Microbiol., 55:1870- 1876, 1989.
- PLETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos. A aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos. Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, Brasília, n.4, p.12-15. 1998.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

## AValiação DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE UM NANOMATERIAL DE CARBONO EM INFECCÕES POR ZIKA VIRUS

Pereira<sup>1</sup>, S. H.; Ladeira<sup>2</sup>, M. S.; Almeida<sup>1</sup>, L. T.; Carvalho<sup>3</sup>, M. M. F.; Pedrosa<sup>3</sup>, M. L.; Ladeira<sup>2</sup>, L. O.; Magalhães<sup>1</sup>, C. L. B.; Silva<sup>1</sup>, B. M.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Ouro Preto, Departamento de Ciências Biológicas/Laboratório de Biologia e Tecnologia de Microrganismos.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Física/Laboratório de Nanomateriais.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Ouro Preto, Departamento de Ciências Biológicas/Laboratório de Nutrição Experimental.

E-mail: samillehenriques@gmail.com

### 1. Introdução

O *Zika virus* (ZIKV) é um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* (FERRARIS et. al., 2019).

Os primeiros casos relatados em humanos de Febre Zika ocorreram na África e Ásia. Em 2007 ocorreu o primeiro surto fora destes continentes, nas Ilhas de Yap. Em 2013 ocorreu uma epidemia na Polinésia Francesa e em 2015 no continente sul-americano (FERRARIS et. al., 2019).

Após o surto no continente americano, foi decretado pela OMS “Emergência de Saúde Pública Internacional”, devido a facilidade de disseminação deste arbovírus, a dificuldade no combate de vetores e a associação com doenças graves como a Síndrome de Guillain-Barré e Síndromes Congênitas, como a microcefalia fetal. (LO; PARK, 2018; O'REILLY et. al, 2018).

Até o momento não existem antivirais ou vacinas disponíveis contra o ZIKV.

Estudos demonstraram que durante as infecções virais as células entram em processo oxidativo, causado pelo aumento de espécies reativas (ER) e pela depleção de antioxidantes, podendo contribuir para vários aspectos da patogênese viral e replicação dos vírus (LEE, 2018; RESHI et al., 2014). Assim, controlar as ER pode ser uma estratégia para combater a infecção viral.

Nanomateriais baseados em carbono (CBN) são de grande interesse para diferentes campos da medicina e biotecnologia devido à sua atividade biológica específica. Sabe-se que baixas doses de CBN podem ativar as funções fisiológicas devido à processos metabólicos complexos. Alguns CBNs possuem atividade antioxidante devido a sua alta capacidade de sequestrar ER (KOVEL et. al, 2019; FOLEY et. al, 2002, IAVICOLI et al, 2018).

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante de um CBN durante a infecção por ZIKV.

### 2. Material e Métodos

#### 2.1 Ensaio de Citotoxicidade por MTT

Antes da realização dos ensaios foi avaliado se as concentrações de trabalho seriam citotóxicas. Para esta avaliação, uma placa de 96 poços foi preparada com células U87MG (ATCC) cultivadas em meio DMEM *high* glicose com 10% de soro fetal bovino (SFB) 24 horas antes do ensaio. Após este tempo, o meio foi retirado e adicionou-se as células o composto diluído em meio de cultura nas concentrações [1600, 800, 400, 200, 100, 50, 25 e 12,5 nM]. Em seguida, a placa foi incubada na estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C por 48 horas. Após a incubação, o meio de cultura foi retirado e adicionou-se 25 µL de brometo 3-

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

(4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5 - difeniltetrazol (MTT) (2 mg/mL) por poço e incubou-se por 90 min. Posteriormente adicionou-se 130 µL de solvente dimetilsulfóxido (DMSO) por poço. A placa foi colocada sob agitação por 15 min. O composto MTT é metabolizado pelas células viáveis, sendo convertido em cristais de formazan, o DMSO é capaz de dissolver estes cristais.

A quantidade de formazan gerado foi mensurada através da leitura da absorbância a 490 nm no leitor de placas Victor X3 (PerkinElmer).

A viabilidade celular foi determinada a partir da porcentagem de células tratadas com CBN viáveis em relação ao controle de células.

### **2.2 Quantificação da capacidade de adsorção de radicais oxigenados (ORAC)**

Para determinar a capacidade antioxidante do composto, foi preparada uma curva de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-ácido tetrametilcromano-2-carboxílico) para calibração. As concentrações utilizadas foram de 10, 20, 30 e 40 µM, a partir de uma solução mãe de 8M/L diluída em tampão fosfato-salino (PBS) (75 mM, pH 7,0).

Foi adicionado a uma placa branca de 96 poços as concentrações de CBN [400, 200, 100, 50, 20, 10 e 5 nM] e logo após foi adicionado a sonda fluorescente fluoresceína (78 nM) dissolvida em PBS. Após 15 min de incubação a 37°C, foi adicionado o radical AAPH (2,2-azinobis (2-amidinopropan) dihidroclorato) a uma concentração de 221 mM. A leitura da fluorescência foi realizada no leitor de placas Victor X3 à 485nm (excitação) e 535nm (emissão) por 1h a cada minuto (adaptado HUANG et. al, 2002; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005; SILVA et al, 2007).

### **2.3 Dosagem de espécies reativas de oxigênio (EROs)**

Para dosagem de EROs, uma placa de 96 poços foi preparada com células U87MG

(ATCC) cultivadas em meio DMEM *high* glicose com 10% de SFB e incubou-se por 40 min. Após a incubação o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com tampão HBSS [0,4 g/L KCl; 0,09 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,06 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,14 g/L CaCl<sub>2</sub>; 0,10 g/L MgCl<sub>2</sub>.6 H<sub>2</sub>O; 1,0 g/L C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>12</sub>; 0,35 g/L NaHCO<sub>3</sub>; 8g NaCl; q.s.p H<sub>2</sub>O milliQ]. Logo após, adicionou-se o CBN [100, 50, 25, 12,5, 6,25 nM] e o ZIKV (MOI 1) e incubou-se por 24 horas. Posteriormente a placa foi lavada com o tampão HBSS e foi adicionada a sonda Carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA (5-(e-6)-carboxi-2',7' - diclorodihidrofluoresceína diacetato) 25 µM por 45 min. Após a incubação, descartou-se a sonda, lavou-se a placa novamente com HBSS e adicionou-se meio sem vermelho de fenol. A leitura da fluorescência foi realizada no leitor de placas Victor X3 à 485nm (excitação) e 535nm (emissão).

### **2.4 Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 5.0. Para os ensaios de Citotoxicidade e Dosagem de espécies reativas de oxigênio foi utilizado teste one-way ANOVA e pós-teste de Tukey com 95% de confiança.

## **3. Resultados e Discussão**

A citotoxicidade do CBN foi avaliada a partir do ensaio de viabilidade celular por MTT. Na Figura 1 é possível observar que nenhuma das concentrações testada apresentou diferenças estatísticas em relação à viabilidade celular entre o controle de células e as células tratadas, portanto nenhuma das concentrações foi citotóxica.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

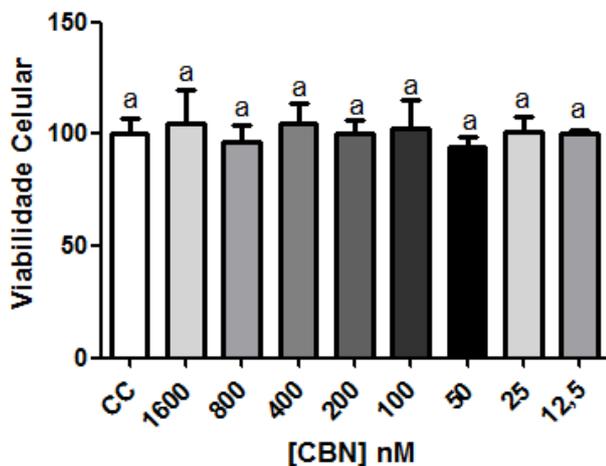


Figura 1: Viabilidade celular por MTT em células U87MG após tratamento com o CBN por 48 horas. Onde *a* representa que não houve diferença estatística para  $p < 0,05$ .

Em seguida foi avaliada a capacidade do CBN de absorver radicais oxigenados. Como pode ser verificado na Figura 2, as menores concentrações apresentaram uma maior capacidade de absorção, este resultado já era esperado, uma vez que em maiores concentrações de CBN pode ocorrer formação de cristais, o que impede a captação das ER. Além disso, o CBN apresentou valores de capacidade de neutralização de radical semelhantes ao Trolox (300-700  $\mu\text{M}$ ) (CAMINI et al, 2018) um análogo da vitamina E solúvel em água e conhecido por ter poderosa inibição de radicais de oxigênio (ANTHONY, SALEH, 2013).

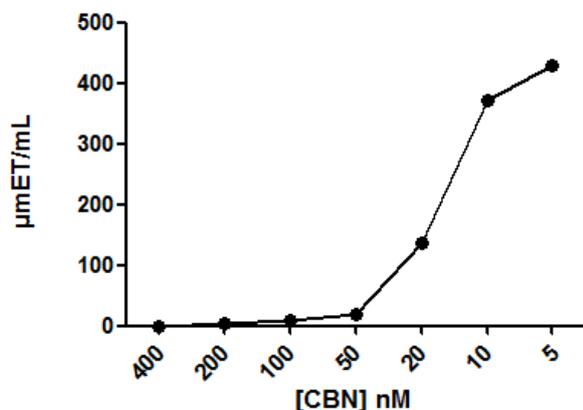


Figura 2: Quantificação da capacidade de absorção de radicais oxigenados (ORAC) do CBN em equivalentes de trolox.

Após a determinação das concentrações ótimas por ORAC foi realizado um ensaio de dosagem de EROs. Os resultados encontrados podem ser observados na Figura 3.

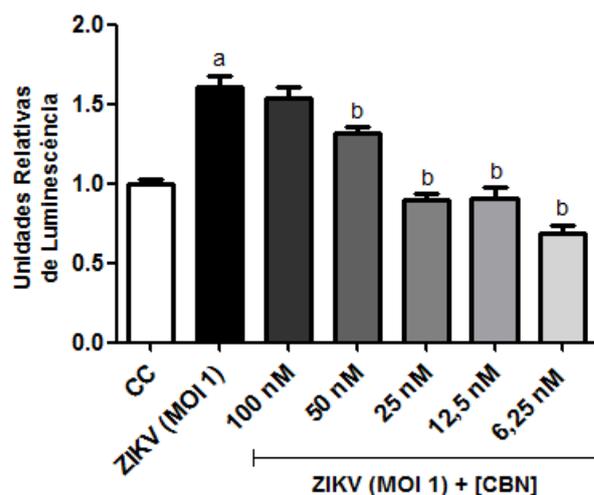


Figura 3: Dosagem de EROs em células infectadas com ZIKV (MOI 1) tratadas com CBN por 24 hs. Onde *a* representa a diferença estatística entre o controle de células e as células infectadas com ZIKV e *b* representa diferença estatística entre as células infectadas com ZIKV e as células infectadas com ZIKV e tratadas com CBN para  $p < 0,05$ .

Ocorreu um aumento das EROs nas células infectadas com ZIKV em relação ao controle de células de 60%, esse comportamento já foi observado para outros arbovírus, como o Mayaro (CAMINI et. al, 2017), esse resultado corrobora com a evidência de que os vírus aumentam o estado oxidativo da célula. As células infectadas com ZIKV e tratadas com CBN apresentaram uma redução significativa de EROs de 17, 44, 43 e 57% nas concentrações de 50, 25, 12,5 e 6,25 nM, respectivamente. Esses resultados demonstram que o CBN é um potencial sequestrador de ER durante a infecção por ZIKV.

## 4. Conclusões

O CBN não apresentou citotoxicidade e sua capacidade de redução de espécies reativas em células infectadas com ZIKV foi satisfatória. Com base na evidência que a formação de

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

ROS induzida por ZIKV representa um mecanismo importante de patogenicidade da infecção, o tratamento antioxidante representaria uma abordagem relevante para o tratamento da Febre Zika.

### 5. Agradecimentos

UFOP, Capes, CNPq, Fapemig.

### 6. Referências Bibliográficas

ANTHONY, K. P.; SALEH, M. A. Free Radical Scavenging and Antioxidant Activities of Silymarin Components. **Antioxidants**, v.2, p. 398-407, 2013.

CAMINI, F. C.; SILVA, T. F.; CAETANO, C. C. S.; ALMEIDA, L. T.; FERRAZ, A. C.; VITORETI, V. M. A.; SILVA, B. M.; SILVA, S. Q.; MAGALHÃES, J. C.; MAGALHÃES, C. L. B. Antiviral activity of silymarin against Mayaro virus and protective effect in virus-induced oxidative stress, **Antiviral Research** v. 158, p. 8-12, 2018.

CAMINI, F. C.; CAETANO, C. C. S.; ALMEIDA, L. T.; GUERRA, J. F. C.; SILVA, B. M.; SILVA, S. Q.; MAGALHÃES, J. C.; MAGALHÃES, C. L. B. Oxidative stress in Mayaro virus infection. **Virus Research**, v. 236, p. 1-8, 2017.

FERRARIS, P.; YSSEL, H.; MISS, D. Zika virus infection: an update. **Microbes and Infection**, v. 19, p. 1286-4579, 2019.

FOLEY, S.; CROWLEY, C.; SMAIHI, M.; BONFILS, C.; ERLANGER, B.F.; SETA, P.; LARROQUE, C. Cellular localization of a water-soluble fullerene derivative. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 294, p.116–119, 2002.

HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCHWOODILL, M.; FLANAGAN, J. A.; PRIOR, R. L. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. **Journal of agricultural and**

**food chemistry**, v. 50, n. 16, p. 4437-4444, 2002.

IAVICOLI, I.; LESO, V.; FONTANA, L.; CALABRESE, E.J. Nanoparticle exposure and hormetic dose-responses: An update. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 805, n. 2019, 2018.

KOVEL, E.; SACHKOVA, A.; VNUKOVA, N.; CHURILOV, G.; KNYAZEVA, E.; KUDRYASHEVA, N. Antioxidant Activity and Toxicity of Fullerenols via Bioluminescence Signaling: Role of Oxygen Substituents. **International Journal of Molecular Sciences**, v.20, n.9, p. 1-16, 2019.

LEE, C. Therapeutic Modulation of Virus-Induced Oxidative Stress via the Nrf2-Dependent Antioxidative Pathway. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2018.

LO D, PARK B. Modeling the spread of the Zika virus using topological data analysis. **PLoS One**, p.13, v.2: e0192120, 2018.

O'REILLY KM, LOWE R, EDMUNDS WJ, MAYAUD P, KUCHARSKI A, EGGO RM, et al. Projecting the end of the Zika virus epidemic in Latin America: a modelling analysis. **BMC Med**, v.16, n.1, 2018.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.

RESHI, M. L.; SU, Y.; HONG, J. **RNA viruses: ROS-Mediated cell death**, *Int. J. Cell. Biol.*, v.2014, p. 467-452, 2014.

SILVA, E.; SOUZA, J.; ROGEZ, H.; REES, J.-F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1012-1018, 2007.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

## CARACTERIZAÇÃO TÉCNICO-FUNCIONAL DA NANOESTRUTURA DE $\beta$ -LACTOGLOBULINA PARA APLICAÇÃO EM PRODUTOS LÁCTEOS

Couto<sup>1</sup>, B. D.; Santos<sup>2</sup>, I. J. B.

<sup>1</sup> Universidade Federal de São João del-Rei, Programa de Pós Graduação em Engenharia Química

<sup>2</sup> Universidade Federal de São João del-Rei, Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos

E-mail: brunnadonofrec@gmail.com

### 1. Introdução

Minas Gerais é o maior produtor de leite do Brasil e grande parte deste leite é destinada a produção de diferentes tipos de queijo (EMBRAPA, 2015) com um consumo per capita em torno de 5,5 kg de queijo por ano (EMBRAPA, 2018).

Apesar de sua grande importância nutricional, os queijos e outros produtos lácteos estão entre os alimentos com maior teor de sódio - NaCl (ANVISA, 2015). O consumo excessivo desse componente gera adversidades na saúde, como a constante elevação da pressão arterial, aumentando o risco de doenças cardiovasculares, que são atualmente as principais causas de mortalidade no Brasil e no mundo (SOUZA, 2016).

O Ministério da Saúde tem organizado estratégias e acordos com associações do setor produtivo, a fim de reduzir gradativamente os elevados índices de sódio em produtos processados, visando a adequação dos níveis de consumo em até 2 g/dia/pessoa até o ano de 2020 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Diante deste desafio, tecnologias surgem com o intuito de otimizar a produção de produtos lácteos, reduzindo o teor de sódio e mantendo suas propriedades e qualidade. A nanotecnologia se destaca como alternativa promissora, melhorando as propriedades e funcionalidades dos alimentos (LIVNEY, 2015).

A proteína  $\beta$ -lactoglobulina possui propriedades funcionais de grande aplicação

na indústria de alimentos, como capacidade de emulsificação, formação de espumas, gelificação e interação com moléculas responsáveis pelo aroma e sabor do produto (ALVES *et al.*, 2008).

O objetivo desse trabalho, portanto, foi caracterizar as propriedades técnico-funcionais da nanoestrutura de  $\beta$ -lactoglobulina para posterior aplicação em queijo minas frescal e outros produtos lácteos, visando à redução do teor de sódio.

### 2. Material e Métodos

A  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) utilizada foi gentilmente cedida pela Davigo Foods International (EUA). A água empregada nos experimentos foi a destilada purificada através de osmose reversa Hidrotek (Portugal) e reagentes químicos de graus analíticos.

#### 2.1. Síntese da nanoestrutura de $\beta$ -lg

A nanoestrutura foi sintetizada via aquecimento. Uma solução de 2 mg.mL<sup>-1</sup> da proteína em 50 mmol.L<sup>-1</sup> de NaCl foi aquecida a 100°C por 60 min. O tamanho da partícula e o índice de polidispersividade (PDI) foram determinados via Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) no equipamento Nanozetasizer (Malvern, Inglaterra).

#### 2.1.2. Teste de estabilidade

A nanoestrutura foi armazenada a 4°C para avaliar sua estabilidade ao longo do tempo, sendo determinado o tamanho da partícula, PDI e potencial zeta nos dias 0, 5, 10, 15, 30 e 60 após a síntese.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

### 2.1.3. Teste de espuma

Amostras da nanoestrutura foram homogeneizadas em Ultra Turrax (Biovera, Brasil) por 1 min em 14000 rpm. Após, acompanhou-se a altura da espuma medindo-as em intervalos de tempo a fim de calcular as variáveis incremento de volume (VI) e estabilidade da espuma (FS), conforme as equações 1 e 2.

$$VI = \left[ \frac{V_T - V_T}{V_E - V_T} \right] \times 100 \quad (1)$$

$$FS = \left[ \frac{V_{Et}}{V_{Et0}} \right] \quad (2)$$

Onde  $V_T$  é o volume total da solução,  $V_E$  é o volume da espuma,  $V_{Et}$  e  $V_{Et0}$  são os volumes da espuma correspondentes aos instantes  $t$  (30, 60 e 120 min) e no tempo zero. Amostras de proteína sem tratamento térmico foram utilizadas como controle.

### 2.1.4. Teste de emulsão

O Índice de Atividade Emulsificante (IAE) da proteína nativa e da proteína nanoestruturada foram determinados de acordo CAMERON *et al.* (1991). Amostras de proteína a 0,1% (m.v<sup>-1</sup>) foram homogeneizadas juntamente com óleo de girassol e água destilada em Ultra Turrax por 1 min a 14000 rpm. Após, amostras de cada emulsão foram retirados em diferentes intervalos de tempo (0, 5, 15 e 30 min) e diluídos em solução SDS 0,1% (m/v). A absorbância foi medida a 500 nm em espectrofotômetro UV-Vis Global Trade Technology (São Paulo, Brasil). O IAE foi calculado de acordo com a Equação 3 e a estabilidade da emulsão (ESI) com a Equação 4.

$$IAE (m^2 \cdot g^{-1}) = \left[ \frac{2 \times 2,303 \times A_0 \times FD}{c \times (1 - \theta) \times 1000} \right] \quad (3)$$

$$ESI = \frac{A_0}{A_0 - A_t} \times t \quad (4)$$

Onde  $A_0$  é a absorbância no tempo igual a zero,  $FD$  é o fator de diluição,  $c$  é a concentração inicial da proteína (g.mL<sup>-1</sup>);  $\theta$  é a fração de óleo (0,25) e  $A_t$  são as

absorbâncias das emulsão diluídas em 30, 60 e 120 min.

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1. Teste de estabilidade

A nanoestrutura de  $\beta$ -lg sintetizada apresentou tamanho médio de  $109,95 \pm 0,68$  nm e PDI de  $0,4062 \pm 0,0539$ . O tamanho corrobora com USKOKOVIĆ (2007), o qual afirma que nanoestruturas são materiais cujo tamanho varia de 10 a 300 nm.

A estabilidade da nanoestrutura mantida a 4°C por 60 dias está demonstrada na Figura 1.

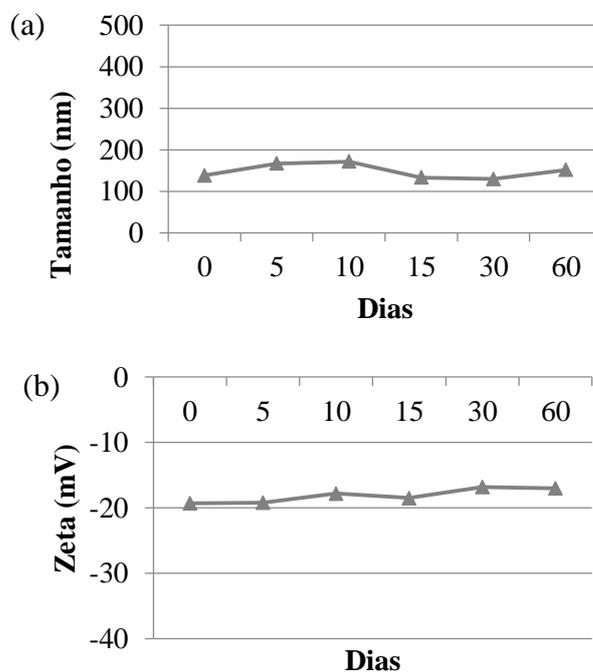


Figura 1 – Análise de estabilidade da nanoestrutura de  $\beta$ -lg através da leitura de (a) tamanho (nm); (b) Potencial Zeta (mv).

Nota-se que o tamanho das partículas e o potencial zeta se mantêm aproximadamente constante durante o experimento. O tamanho se manteve entre 138,3 a 151,8 nm. Já o PDI ficou próximo de  $0,4078 \pm 0,0487$ , que é um valor considerado eficiente pela literatura (MADALENA *et al.*, 2016), indicando que as nanoestruturas tiveram uma boa polidispersividade.

Este sistema é considerado semi-estável visto que o valor do potencial zeta se manteve

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

em aproximadamente  $-18,1 \pm 1,0770$  mV e, para ser considerado um sistema totalmente estável, são considerados valores acima de +30mV e abaixo de -30mV (DIARRASSOUBA, 2013). Isso ocorre, pois a estabilidade coloidal pode ser comprometida pela interação entre as cargas opostas das partículas. O processo de aquecimento pode permitir a dissolução de alguns agregados proteicos, promovendo rearranjos estruturais por quebra das ligações dissulfeto, o que resulta em desdobramento e exposição dos grupos sulfídricos, os quais podem formar ligações inter e intra-moleculares, ocasionando a agregação de proteínas (MADALENA, *et al.*, 2016).

### 3.2. Teste de espuma

Pode-se observar na Tabela 1 que a nanoestrutura obteve melhor estabilidade da espuma do que a proteína nativa. Este resultado é corroborado por Leman e Doga (2003), em que o tratamento térmico de  $\beta$ -lactoglobulina aumentou a estabilidade da espuma.

Tabela 1- Valores de VI e FS para a proteína nativa e para nanoestrutura de  $\beta$ -Ig nos tempos 30, 60 e 120 minutos

	Proteína Nativa	Nanoestrutura
VI	$19,56 \pm 2,34^a$	$33,33 \pm 1,59^b$
FS <sub>30</sub>	$36,51 \pm 5,49^a$	$64,54 \pm 5,06^b$
FS <sub>60</sub>	$20,63 \pm 6,87^a$	$51,52 \pm 2,62^b$
FS <sub>120</sub>	$9,05 \pm 1,65^a$	$35,45 \pm 5,06^b$

<sup>a-b</sup> Diferentes sobrescritos diferem significativamente a  $p \leq 0,05$  de acordo com o teste de Tukey.

Foi observado que, após 120 min, a proteína nativa não tinha quase nenhuma espuma, enquanto a nanoestrutura apresentava 35,45, resultado semelhante ao de Costa (2016). A nanoestrutura demonstrou maior capacidade de formação e estabilização de espuma do que a proteína nativa. A melhoria na capacidade de formação de espuma pela nanoestrutura de  $\beta$ -Ig representa uma alternativa viável para a substituição de outros ingredientes na indústria de alimentos, especialmente laticíneos.

O aquecimento moderado em tempos determinados na formação da nanoestrutura causa desdobramento parcial da estrutura da proteína, aumenta a flexibilidade da cadeia proteica, consequentemente aumenta a capacidade de formação de espuma (WOOSTER; AUGUSTIN, 2007).

### 3.3. Teste de emulsão

A Tabela 2 mostra que o IAE e o ESI da nanoestrutura foram maiores do que da proteína nativa. O ESI é de maior interesse, uma vez que prova que a nanoestrutura possui maior capacidade de estabilizar a emulsão, sendo uma característica importante em alimentos onde a ligação e a texturização da água são necessárias, como em queijos e iogurtes (HOLT, 2000).

Tabela 2- Valores de IAE e ESI para a proteína nativa e para nanoestrutura de  $\beta$ -Ig

	Proteína Nativa	Nanoestrutura
IAE	$114,64 \pm 3,12^a$	$167,86 \pm 3,54^b$
ESI	$112,00 \pm 3,46^a$	$164,00 \pm 3,46^b$

<sup>a-b</sup> Diferentes sobrescritos diferem significativamente a  $p \leq 0,05$  de acordo com o teste de Tukey.

Este resultado indica que a nanoestrutura possui maior atividade interfacial que a proteína nativa. Na emulsão, as proteínas migram através da fase aquosa para a interface, se reorganizando para posicionar os aminoácidos hidrofóbicos na fase oleosa e os hidrofílicos na fase aquosa. Em seguida, se agregam na superfície, formando um filme viscoelástico em torno da gota de óleo, mantendo a emulsão estável (DICKINSON, 2001).

A formação de nanopartículas protéicas depende diretamente do desdobramento da estrutura da proteína, que sofre alterações conformacionais dependentes da composição, concentração, pH e força iônica, alterando as propriedades técnico-funcionais (PATHAK; THASSU, 2009).

### 4. Conclusões

Obteve-se a nanoestrutura de  $\beta$ -Ig, a qual se mostrou estável durante o período de armazenamento a 4°C, mantendo o índice de polidispersividade próximo ou abaixo de 0,4.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

A nanoestrutura possui melhores propriedades técnico-funcionais do que a proteína nativa, visto que apresentou maior formação e estabilidade de espuma e maior capacidade de emulsão. Sendo assim, se mostra uma alternativa promissora para substituição de outros ingredientes, como o sódio, em alimentos processados, em especial, produtos lácteos.

### 5. Agradecimentos

Os autores agradecem ao laboratório multiusuário CiPharma da UFOP pelas medidas em NanoZeta Sizer, ao projeto “Asymmetric Flow Field Flow Fractionation” (FAPEMIG CDS – APQ 01510-14).

### 6. Referências Bibliográficas

ALVES, J. G. L. F.; BRENNEISEN, J.; NINNI, L.; MEIRELLES, A. J. A.; MAURER, G. Aqueous Two-Phase Systems of Poly(ethylene glycol) and Sodium Citrate: Experimental Results and Modeling. *Journal of Chemical & Engineering*, v. 53 (7), p. 1587-1594, 2008.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Informe Técnico*, n.69 de 2015.

CAMERON, D. R.; WEBER, M.E.; IDZIAK, E.S.; NEUFELD, R.J.; COOPER, D.G. Determination of interfacial areas in emulsions using turbidimetric and droplet size data: correction of the formula for emulsifying activity index. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v.39, n.4, p.655-659, Apr. 1991.

COSTA, R. N. Nanoestruturas de  $\beta$ -lactoglobulina e sua capacidade de encapsular moléculas bioativas. *Trabalho de Conclusão de Curso*. Graduação em Engenharia de Bioprocessos. Universidade Federal de São João del-Rei, 2016.

DIARRASSOUBA, F., LIANG, L., REMONDETTO, G., SUBIRADE, M. Nanocomplex formation between riboflavin and  $\beta$ -lactoglobulin: spectroscopic investigation and biological characterization. *Food Research International*, 52(2), 557-567, 2013.

DICKINSON, E. Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 197-210, 2001.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Panorama do Leite*. Ano 7, n.65, Outubro de 2015.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Anuário do Leite*. Agosto, 2018.

HOLT, C. Molecular basis of whey protein food functionalities. *Australian Journal of Dairy Technology*, v. 55(2), p. 53–55, 2000.

LEMAN, J.; DOGA, T. Effect of temperatura and high pressure on the foaming properties of beta-lactoglobulin salted out at pH 2. *Commun Agric Appl Biol Sci*, v. 68, n. 2, pt. B, p. 489-492, 2003.

LIVNEY, Y. D. Nanostructured delivery systems in food: latest developments and potential future directions. *Current Opinion in Food Science*, v. 3, p. 125-135, 2015.

MADALENA, D. A.; RAMOS, O. L.; PEREIRA, R. N.; BOURBON, A. I.; PINHEIRO, A. C.; XAVIER MALCATA, F.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. In vitro digestion and stability assessment of  $\beta$ -lactoglobulin/riboflavin nanostructures. *Food Hydrocolloids*, Portugal, v. 58, p. 89-97, 2016. Ministério da Saúde, [2012]. Disponível em: <[http://dab.saude.gov.br/portaldab/ape\\_promocao\\_da\\_saude.php?conteudo=reducao](http://dab.saude.gov.br/portaldab/ape_promocao_da_saude.php?conteudo=reducao)>.

Acessado em: 15 de agosto de 2019.

PATHAK, Y.; THASSU, D. Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, First Edition, 2009.

SOUZA, A. M. Impacto da redução do teor de sódio em alimentos processados no consumo de sódio no Brasil. *Cad. Saúde Pública*, v. 32, 2016.

USKOKOVIĆ, V. Nanotechnologies: What we do not know. *Technology in Society*, v. 29, n. 1, p. 43-61, 2007.

WOOSTER, T. J.; AUGUSTIN, M. A. Rheology of whey protein-dextran conjugate films at the air/water interface. *Food Hydrocolloids*, 21(7), 1072–1080, 2007.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

## EFEITO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA NA SANITIZAÇÃO DE BIOFILMES BACTERIANOS EM PLACAS DE AÇO INOXIDÁVEL

Souza<sup>1</sup>, S. M. e Santos<sup>1</sup>, I. J. B.

<sup>1</sup>Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), *Campus* Alto Paraopeba (CAP), Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos (DQBio), Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil.

E-mail: souzasaymonm@gmail.com

### 1. Introdução

A presença de biofilmes em instalações industriais, como equipamentos e ferramentas de laticínios, aumenta as taxas de corrosão da superfície, reduz a eficácia de transferência de calor, diminui o fluxo nas tubulações e promove odores indesejáveis, aspectos que reduzem a qualidade final do produto, provocando perdas econômicas. Todavia, a maior preocupação da presença dos biofilmes nas instalações, atualmente, são as Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) (Vu *et al.*, 2009; Martin, 2015). As principais indústrias afetadas são laticínios, processamento de peixes, aves, carnes e alimentos prontos para o consumo. Dentre estes, o leite é um produto muito perecível e vulnerável a contaminação por diversos microrganismos, sendo os principais *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Furukawa *et al.*, 2010; Martin, 2015).

Biofilmes também podem ser definidos como aglomerados de células sésseis, de apenas uma espécie ou em associação, Gram-positivas ou negativas, embebidos em uma matriz extracelular composta por cerca de 75-90 % de exopolissacarídeos (EPS – atua como barreira física, adsorvendo cátions, metais e toxinas, e protegendo contra radiação Ultra Violeta, mudança de pH, dessecação e choques osmóticos), apresentando diferentes características fenotípicas, fisiológicas, metabólicas e de transcrição genética (Andrade Boari *et al.*, 2009; Vu *et al.*, 2009).

Os biofilmes se desenvolvem em 5 estágios (adesão inicial, adesão irreversível, desenvolvimento inicial da estrutura,

maturação e dispersão) e qualquer superfície pode ser vulnerável a sua formação, como plástico, vidro, metal e alimentos. Para alcançar uma certa maturidade, são necessários 10 dias ou mais, sendo que no último estágio ocorre o desprendimento parcial do biofilme como forma de colonização de novos nichos (Kumar e Anand, 1998; Srey *et al.*, 2013).

As indústrias utilizam diferentes produtos para remover os biofilmes, porém, os sanitizantes apresentam dificuldade para alcançar os sítios de ação, como a membrana externa de células Gram-negativas (Andrade Boari *et al.*, 2009). Ainda, a limpeza remove apenas cerca de 90 % das bactérias presentes na superfície e não as elimina, possibilitando sua re-adesão a outras superfícies. Estudos mostram que produtos químicos podem causar resistência nas bactérias, permitindo sua sobrevivência e proliferação em altas concentrações de desinfetantes (Srey *et al.*, 2013). Portanto, outras estratégias para controlar os biofilmes devem ser aplicadas, como a utilização de nanotecnologia.

A Engenharia de Nanomateriais tem desenvolvido superfícies com propriedades antimicrobianas, pela ação de nanopartículas de prata (AgNP), de ouro, de dióxido de titânio e de óxido de zinco (Pometto Iii e Demirci, 2015). As AgNPs interagem com a célula causando desestabilização e quando está em contato com o DNA, inibe o crescimento microbiano (Morones *et al.*, 2005; Durán *et al.*, 2010).

A aplicação da nanotecnologia para melhorar a segurança alimentar já é uma

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

realidade, porém existem poucos produtos eficientes no mercado com nanoestruturas para sanitização de biofilmes formados em laticínios. Com isso, este projeto almeja comprovar a eficiência das nanopartículas de prata para remoção de biofilmes bacterianos formados em placas de aço inoxidável utilizados em produtos lácteos.

## 2. Material e Métodos

Os reagentes de grau analíticos e as bactérias: *Escherichia coli* ATCC 01574, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 foram utilizados dos laboratórios da Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Alto Paraopeba. Foram aplicados sanitizantes de uso convencional em indústrias de alimentos, sendo eles: solução de Hipoclorito de Sódio e detergente alcalino comercial LAT 300 PLUS a 0,8 % (v/v) (Qualimilk, StartQuímica).

Para comparar a eficácia da sanitização industrial, placas metálicas foram tratadas com solução de Nanopartículas de Prata (AgNP) a 0,0019 %, 0,00095 % e 0,000475 % (m/v). A síntese dessa nanoestrutura foi validada anteriormente obtendo as melhores condições, com tamanho médio caracterizado a  $20,08 \pm 0,17$  nm e com PDI (Índice de Polidispersão) a  $0,321 \pm 0,047$  (Bianchi *et al.*, 2018).

Para a formação do biofilme, foram utilizados cupons de aço inoxidável AISI 304 (1 x 2 x 0,39 cm), previamente esterilizados. 60 cupons foram suspensos em uma solução de 1000 mL de leite integral esterilizado com a adição de 200  $\mu$ L de cada inóculo previamente ativado (Figura 1). Estes sistemas seguiram para armazenamento por 10 dias, a  $6 (\pm 2)$  °C e em agitação constante a 60 rpm.

A análise foi realizada em duplicata e os cupons foram coletados a cada 48 h, com a substituição do leite, barra magnética e inóculo.

Os cupons contendo o biofilme foram lavados com solução salina 0,9 % (m/v) (NaCl – Dinâmica) estéril. Um aparato foi montado conforme a Figura 2, para simular a sanitização industrial.

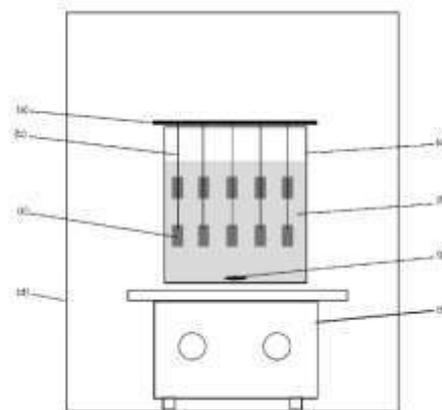


Figura 1 - Sistema para formação do biofilme bacteriano: (a) suporte metálico; (b) fio de aço; (c) cupons; (d) geladeira; (e) recipiente de polipropileno; (f) leite com inóculo; (g) barra magnética; e (h) agitador magnético. Adaptado de Andrade Boari *et al.* (2009).

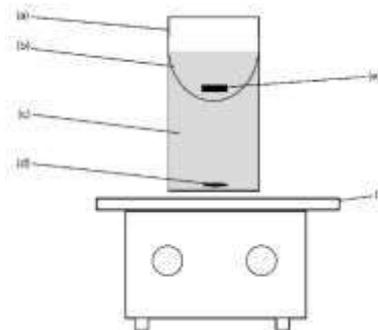


Figura 2 - Sistema para sanitização: (a) tubo de polipropileno; (b) rede de nylon; (c) sanitizante; (d) barra magnética; (e) cupom com biofilme; e (f) agitador magnético. Adaptado de Furukawa *et al.* (2010).

O cupom foi imerso em 10 mL do agente sanitizante, com a substituição da solução a cada cupom, sob agitação a 1500 rpm por 30 min. Então, os cupons foram lavados com solução salina contendo 1 % (m/v) de tiosulfato de sódio.

Então, os cupons foram imersos em 5 mL de solução salina 0,9 % (m/v) com 0,1 % de água peptonada, sob à ação do ultrassom por 15 min. Alíquotas (1:10) de células oriundas da solução foram diluídas seriadamente e plaqueadas pela técnica de *spread plate* em ágar de triptona de soja (TSA – Biobras Diagnósticos). As placas de petri seguiram para incubação a 35 °C por 24 h. Após isso, foi feito a contagem das bactérias.

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

### 3. Resultados e Discussão

A contagem de bactérias totais, em 10 dias, de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* estão dispostas nas Figuras 3 e 4, respectivamente. Os resultados omissos, dos dias 4, 8 e 10, representam que nenhuma célula foi recuperada ou foram encontrados valores inferiores a 25 UFC/mL, exceto para o sanitizante comercial (LAT 300 PLUS) apresentando, no 4º dia, muitas células sobreviventes.

Os 2 primeiros dias não foram suficientes para aderência dos biofilmes, uma vez que, geralmente, em um primeiro momento há um condicionamento da superfície pela adsorção de moléculas orgânicas, como proteínas do leite, que neutralizam as cargas que poderiam repelir os microrganismos (Kumar e Anand, 1998; Kasnowski *et al.*, 2010).

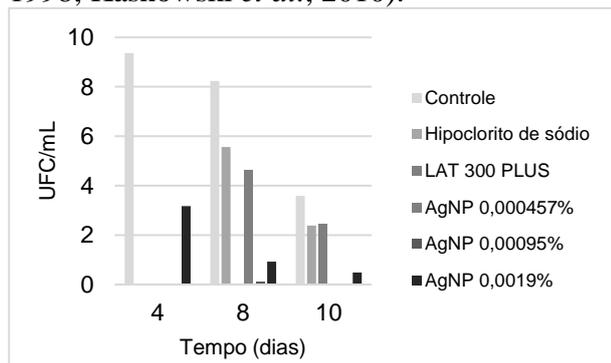


Figura 3 - Quantificação das células sobreviventes de *E. coli*, ao longo de 10 dias.

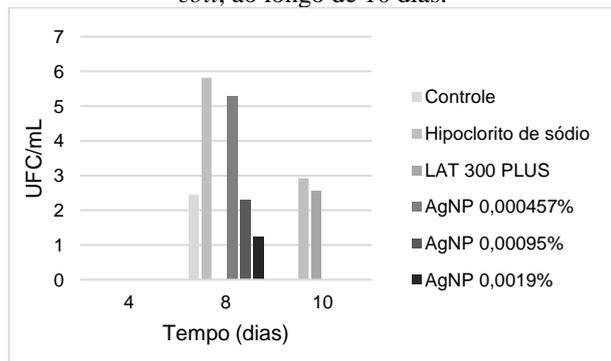


Figura 4 - Quantificação das células sobreviventes de *S. aureus*, ao longo de 10 dias.

Após 4 dias, os cupons apresentaram uma formação inicial do biofilme, como pode ser observado pelo controle (Figuras 3 e 4). Como relatado por Kasnowski *et al.* (2010), o estágio

inicial demanda o transporte de células e nutrientes para a superfície antes de iniciar o processo de adesão. Vale ressaltar que essa etapa ainda é reversível e por isso os biofilmes iniciais são mais susceptíveis a remoção, justificando o fato de que os sanitizantes aplicados, exceto o LAT 300 PLUS, foram capazes eliminar os microrganismos dos cupons.

Além disso, é possível perceber que a bactéria *S. aureus* não foi capaz de aderir aos cupons com apenas 4 dias. Segundo Pompermayer e Gaylarde (2000), há uma superioridade das bactérias gram-negativas para adesão em superfícies por causa de aparatos celulares, mais resistentes, como flagelos e pilis, bem como seu menor tempo de geração, permitindo seu melhor desenvolvimento e domínio em relação às gram-positivas.

Após 8 dias, os biofilmes começaram a apresentar uma maior resistência aos sanitizantes aplicados. Analisando os resultados da *E. coli*, além do sanitizante comercial, a solução de AgNP também se mostrou eficiente, para as concentrações de 0,0019 % e 0,00095 %, reduzindo cerca de 8 logs de concentração celular. A concentração de 0,000457 % foi capaz de reduzir cerca de 4 logs, enquanto o Hipoclorito de Sódio reduziu apenas 3 logs. Em relação a *S. aureus*, apenas o LAT 300 PLUS e a maior concentração de AgNP foram eficientes para sua remoção.

Em estágios finais, o biofilme maduro se torna fonte de endotoxinas e polissacarídeos que são liberados para o meio. Em função da forte adesão à superfície, a remoção destes biofilmes é tida como extremamente difícil (Kasnowski *et al.*, 2010). E apesar de sua estrutura mais desenvolvida, após 10 dias, a solução de AgNP, em todas as concentrações, se mostrou eficiente, removendo o biofilme aderido à superfície.

Entretanto, os sanitizantes Hipoclorito de Sódio e LAT 300 PLUS não foram tão eficientes na remoção do biofilme, reduzindo apenas 1 log na concentração celular. Este

11 a 13 de setembro de 2019  
Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil

resultado induz que a nanopartícula pode apresentar melhores resultados que os sanitizantes comerciais.

Outro fato interessante é que mesmo a baixas concentrações (como  $4,57 \times 10^{-4}$  % (m/v)) de Nanopartículas de Prata, há ação antimicrobiana, e com isso, reduz os custos de aplicação.

#### 4. Considerações Finais

Biofilmes de *E. coli* e *S. aureus* foram formados em placas de aço inoxidável, tendo o leite como substrato. Inicialmente o biofilme estava em fase de formação e por isso sua remoção foi facilitada, porém, a partir do 6º dia as bactérias se tornaram mais resistentes aos sanitizantes, com exceção da Nanopartícula de Prata. Assim, foi possível confirmar a ação antimicrobiana da prata nanoestruturada e seu potencial para aplicação como sanitizante industrial.

#### 5. Agradecimentos

Os autores agradecem ao laboratório multiusuário CiPharma da UFOP pelas medidas em NanoZeta Sizer, ao projeto “Asymmetric Flow Field Flow Fractionation” (FAPEMIG CDS – APQ 01510-14).

#### 6. Revisão bibliográfica

ANDRADE BOARI, C. et al. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, 2009. ISSN 0101-2061.

BIANCHI, J. R. D. O.; SOUZA, S. M. D.; SANTOS, I. J. B. D. **Otimização da síntese química de nanopartículas de prata para aplicação em embalagens para alimentos**. XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos Belém, PA 2018.

DURÁN, N. et al. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 6, p. 949-959, 2010. ISSN 0103-5053.

FURUKAWA, S. et al. Removing *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms on stainless steel by cleaning-in-place (CIP) cleaning agents. **Food Control**, v. 21, n. 5, p. 669-672, 2010. ISSN 0956-7135.

KASNOWSKI, M. C. et al. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 15, p. 1-23, 2010.

KUMAR, C. G.; ANAND, S. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International journal of food microbiology**, v. 42, n. 1-2, p. 9-27, 1998. ISSN 0168-1605.

MARTIN, J. G. P. **Biofilmes de Staphylococcus aureus isolados de laticínios produtores de queijo Minas frescal**. 2015. Universidade de São Paulo

MORONES, J. R. et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, n. 10, p. 2346, 2005. ISSN 0957-4484.

POMETTO III, A. L.; DEMIRCI, A. **Biofilms in the food environment**. John Wiley & Sons, 2015. ISBN 111886414X.

POMPERMAYER, D. M.; GAYLARDE, C. C. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. **Food Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 361-365, 2000. ISSN 0740-0020.

SREY, S.; JAHID, I. K.; HA, S.-D. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. **Food control**, v. 31, n. 2, p. 572-585, 2013. ISSN 0956-7135.

VU, B. et al. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2535-2554, 2009.