

# Ensino e Pesquisa em Bioquímica



**Érica de Melo Azevedo**  
(Organizadora)

**Atena**  
Editora  
Ano 2021

# Ensino e Pesquisa em Bioquímica



**Érica de Melo Azevedo**  
(Organizadora)

**Atena**  
Editora  
Ano 2021

**Editora Chefe**

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

**Assistentes Editoriais**

Natalia Oliveira

Bruno Oliveira

Flávia Roberta Barão

**Bibliotecária**

Janaina Ramos

**Projeto Gráfico e Diagramação**

Natália Sandrini de Azevedo

Camila Alves de Cremo

Luiza Alves Batista

Maria Alice Pinheiro

**Imagens da Capa**

Shutterstock

**Edição de Arte**

Luiza Alves Batista

**Revisão**

Os Autores

2021 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do Texto © 2021 Os autores

Copyright da Edição © 2021 Atena Editora

Direitos para esta edição cedidos à Atena Editora pelos autores.



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

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. Permitido o *download* da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

**Conselho Editorial**

**Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**

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

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

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

Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais  
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília  
Prof. Dr. Carlos Antonio de Souza Moraes – Universidade Federal Fluminense  
Prof. Dr. Crisóstomo Lima do Nascimento – Universidade Federal Fluminense  
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa  
Prof. Dr. Daniel Richard Sant'Ana – Universidade de Brasília  
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia  
Profª Drª Dilma Antunes Silva – Universidade Federal de São Paulo  
Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Farias – Universidade Estácio de Sá  
Prof. Dr. Elson Ferreira Costa – Universidade do Estado do Pará  
Prof. Dr. Eloi Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima  
Prof. Dr. Gustavo Henrique Cepolini Ferreira – Universidade Estadual de Montes Claros  
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie de Maria Ausiliatrice  
Prof. Dr. Jadson Correia de Oliveira – Universidade Católica do Salvador  
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense  
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins  
Prof. Dr. Luis Ricardo Fernandes da Costa – Universidade Estadual de Montes Claros  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Pontifícia Universidade Católica de Campinas  
Profª Drª Maria Luzia da Silva Santana – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador  
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. William Cleber Domingues Silva – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

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

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano  
Profª Drª Carla Cristina Bauermann Brasil – Universidade Federal de Santa Maria  
Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás  
Prof. Dr. Cleberton Correia Santos – Universidade Federal da Grande Dourados  
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná  
Profª Drª Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia  
Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa  
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Fágner Cavalcante Patrocínio dos Santos – Universidade Federal do Ceará  
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof. Dr. Jael Soares Batista – Universidade Federal Rural do Semi-Árido  
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Profª Drª Lina Raquel Santos Araújo – Universidade Estadual do Ceará  
Prof. Dr. Pedro Manuel Villa – Universidade Federal de Viçosa  
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão  
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará  
Profª Drª Talita de Santos Matos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Dr. Tiago da Silva Teófilo – Universidade Federal Rural do Semi-Árido



Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

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

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Débora Luana Ribeiro Pessoa – Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elizabeth Cordeiro Fernandes – Faculdade Integrada Medicina

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira

Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Prof. Dr. Fernando Mendes – Instituto Politécnico de Coimbra – Escola Superior de Saúde de Coimbra

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras

Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Helio Franklin Rodrigues de Almeida – Universidade Federal de Rondônia

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco

Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande

Prof. Dr. Jefferson Thiago Souza – Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr. Jesus Rodrigues Lemos – Universidade Federal do Piauí

Prof. Dr. Jônatas de França Barros – Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará

Prof. Dr. Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande

Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Tatiane Gonçalves Sá – Universidade do Estado do Pará

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Regiane Luz Carvalho – Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

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

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto

Prof. Dr. Carlos Eduardo Sanches de Andrade – Universidade Federal de Goiás

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná

Prof. Dr. Cleiseano Emanuel da Silva Paniagua – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás

Prof. Dr. Douglas Gonçalves da Silva – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
 Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Érica de Melo Azevedo – Instituto Federal do Rio de Janeiro  
 Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará  
 Prof<sup>a</sup> Dra. Jéssica Verger Nardeli – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho  
 Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande  
 Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciana do Nascimento Mendes – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte  
 Prof. Dr. Marcelo Marques – Universidade Estadual de Maringá  
 Prof. Dr. Marco Aurélio Kistemann Junior – Universidade Federal de Juiz de Fora  
 Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba  
 Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
 Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Priscila Tessmer Scaglioni – Universidade Federal de Pelotas  
 Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

### **Linguística, Letras e Artes**

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins  
 Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Angeli Rose do Nascimento – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro  
 Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carolina Fernandes da Silva Mandaji – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
 Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Denise Rocha – Universidade Federal do Ceará  
 Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões  
 Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
 Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná  
 Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará  
 Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Regina Gardacho Pietrobon – Universidade Estadual do Centro-Oeste  
 Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia

### **Conselho Técnico Científico**

Prof. Me. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo  
 Prof. Me. Adalberto Zorzo – Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza  
 Prof. Dr. Adailson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba  
 Prof. Dr. Adilson Tadeu Basquerote Silva – Universidade para o Desenvolvimento do Alto Vale do Itajaí  
 Prof. Dr. Alex Luis dos Santos – Universidade Federal de Minas Gerais  
 Prof. Me. Alexsandro Teixeira Ribeiro – Centro Universitário Internacional  
 Prof<sup>a</sup> Ma. Aline Ferreira Antunes – Universidade Federal de Goiás  
 Prof. Me. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão  
 Prof<sup>a</sup> Ma. Andréa Cristina Marques de Araújo – Universidade Fernando Pessoa  
 Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico  
 Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Andrezza Miguel da Silva – Faculdade da Amazônia  
 Prof<sup>a</sup> Ma. Anelisa Mota Gregoleti – Universidade Estadual de Maringá  
 Prof<sup>a</sup> Ma. Anne Karynne da Silva Barbosa – Universidade Federal do Maranhão  
 Prof. Dr. Antonio Hot Pereira de Faria – Polícia Militar de Minas Gerais  
 Prof. Me. Armando Dias Duarte – Universidade Federal de Pernambuco  
 Prof<sup>a</sup> Ma. Bianca Camargo Martins – UniCesumar

Profª Ma. Carolina Shimomura Nanya – Universidade Federal de São Carlos  
Prof. Me. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Me. Christopher Smith Bignardi Neves – Universidade Federal do Paraná  
Prof. Ma. Cláudia de Araújo Marques – Faculdade de Música do Espírito Santo  
Profª Drª Cláudia Taís Siqueira Cagliari – Centro Universitário Dinâmica das Cataratas  
Prof. Me. Clécio Danilo Dias da Silva – Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Me. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará  
Profª Ma. Daniela da Silva Rodrigues – Universidade de Brasília  
Profª Ma. Daniela Remião de Macedo – Universidade de Lisboa  
Profª Ma. Dayane de Melo Barros – Universidade Federal de Pernambuco  
Prof. Me. Douglas Santos Mezacas – Universidade Estadual de Goiás  
Prof. Me. Edevaldo de Castro Monteiro – Embrapa Agrobiologia  
Prof. Me. Eduardo Gomes de Oliveira – Faculdades Unificadas Doctum de Cataguases  
Prof. Me. Eduardo Henrique Ferreira – Faculdade Pitágoras de Londrina  
Prof. Dr. Edwaldo Costa – Marinha do Brasil  
Prof. Me. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita  
Prof. Me. Ernane Rosa Martins – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás  
Prof. Me. Euvaldo de Sousa Costa Junior – Prefeitura Municipal de São João do Piauí  
Prof. Dr. Everaldo dos Santos Mendes – Instituto Edith Theresa Hedwing Stein  
Prof. Me. Ezequiel Martins Ferreira – Universidade Federal de Goiás  
Profª Ma. Fabiana Coelho Couto Rocha Corrêa – Centro Universitário Estácio Juiz de Fora  
Prof. Me. Fabiano Eloy Atílio Batista – Universidade Federal de Viçosa  
Prof. Me. Felipe da Costa Negrão – Universidade Federal do Amazonas  
Prof. Me. Francisco Odécio Sales – Instituto Federal do Ceará  
Profª Drª Germana Ponce de Leon Ramírez – Centro Universitário Adventista de São Paulo  
Prof. Me. Gevair Campos – Instituto Mineiro de Agropecuária  
Prof. Me. Givanildo de Oliveira Santos – Secretaria da Educação de Goiás  
Prof. Dr. Guilherme Renato Gomes – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Me. Gustavo Krahll – Universidade do Oeste de Santa Catarina  
Prof. Me. Helton Rangel Coutinho Junior – Tribunal de Justiça do Estado do Rio de Janeiro  
Profª Ma. Isabelle Cerqueira Sousa – Universidade de Fortaleza  
Profª Ma. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia  
Prof. Me. Javier Antonio Albornoz – University of Miami and Miami Dade College  
Prof. Me. Jhonatan da Silva Lima – Universidade Federal do Pará  
Prof. Dr. José Carlos da Silva Mendes – Instituto de Psicologia Cognitiva, Desenvolvimento Humano e Social  
Prof. Me. Jose Elyton Batista dos Santos – Universidade Federal de Sergipe  
Prof. Me. José Luiz Leonardo de Araujo Pimenta – Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria Uruguay  
Prof. Me. José Messias Ribeiro Júnior – Instituto Federal de Educação Tecnológica de Pernambuco  
Profª Drª Juliana Santana de Curcio – Universidade Federal de Goiás  
Profª Ma. Juliana Thaisa Rodrigues Pacheco – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Kamilly Souza do Vale – Núcleo de Pesquisas Fenomenológicas/UFPA  
Prof. Dr. Kárpio Márcio de Siqueira – Universidade do Estado da Bahia  
Profª Drª Karina de Araújo Dias – Prefeitura Municipal de Florianópolis  
Prof. Dr. Lázaro Castro Silva Nascimento – Laboratório de Fenomenologia & Subjetividade/UFPR

Prof. Me. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof<sup>a</sup> Ma. Lilian Coelho de Freitas – Instituto Federal do Pará  
Prof<sup>a</sup> Ma. Liliani Aparecida Sereno Fontes de Medeiros – Consórcio CEDERJ  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lívia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás  
Prof. Dr. Lucio Marques Vieira Souza – Secretaria de Estado da Educação, do Esporte e da Cultura de Sergipe  
Prof. Dr. Luan Vinicius Bernardelli – Universidade Estadual do Paraná  
Prof<sup>a</sup> Ma. Luana Ferreira dos Santos – Universidade Estadual de Santa Cruz  
Prof<sup>a</sup> Ma. Luana Vieira Toledo – Universidade Federal de Viçosa  
Prof. Me. Luis Henrique Almeida Castro – Universidade Federal da Grande Dourados  
Prof<sup>a</sup> Ma. Luma Sarai de Oliveira – Universidade Estadual de Campinas  
Prof. Dr. Michel da Costa – Universidade Metropolitana de Santos  
Prof. Me. Marcelo da Fonseca Ferreira da Silva – Governo do Estado do Espírito Santo  
Prof. Dr. Marcelo Máximo Purificação – Fundação Integrada Municipal de Ensino Superior  
Prof. Me. Marcos Aurelio Alves e Silva – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo  
Prof<sup>a</sup> Ma. Maria Elanny Damasceno Silva – Universidade Federal do Ceará  
Prof<sup>a</sup> Ma. Marileila Marques Toledo – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri  
Prof. Me. Pedro Panhoca da Silva – Universidade Presbiteriana Mackenzie  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Poliana Arruda Fajardo – Universidade Federal de São Carlos  
Prof. Me. Ricardo Sérgio da Silva – Universidade Federal de Pernambuco  
Prof. Me. Renato Faria da Gama – Instituto Gama – Medicina Personalizada e Integrativa  
Prof<sup>a</sup> Ma. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal  
Prof. Me. Robson Lucas Soares da Silva – Universidade Federal da Paraíba  
Prof. Me. Sebastião André Barbosa Junior – Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Prof<sup>a</sup> Ma. Silene Ribeiro Miranda Barbosa – Consultoria Brasileira de Ensino, Pesquisa e Extensão  
Prof<sup>a</sup> Ma. Solange Aparecida de Souza Monteiro – Instituto Federal de São Paulo  
Prof<sup>a</sup> Ma. Taiane Aparecida Ribeiro Nepomoceno – Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Prof. Me. Tallys Newton Fernandes de Matos – Faculdade Regional Jaguaribana  
Prof<sup>a</sup> Ma. Thatianny Jasmine Castro Martins de Carvalho – Universidade Federal do Piauí  
Prof. Me. Tiago Silvio Dedoné – Colégio ECEL Positivo  
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

**Editora Chefe:** Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira  
**Bibliotecária:** Janaina Ramos  
**Diagramação:** Maria Alice Pinheiro  
**Correção:** Mariane Aparecida Freitas  
**Edição de Arte:** Luiza Alves Batista  
**Revisão:** Os Autores  
**Organizadora:** Érica de Melo Azevedo

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)	
E59	Ensino e pesquisa em bioquímica / Organizadora Érica de Melo Azevedo. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2021.  Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web Inclui bibliografia ISBN 978-65-5706-803-8 DOI 10.22533/at.ed.038211202  1. Bioquímica. I. Azevedo, Érica de Melo (Organizadora). II. Título.  CDD 572
Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166	

**Atena Editora**  
Ponta Grossa – Paraná – Brasil  
Telefone: +55 (42) 3323-5493  
[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)  
contato@atenaeditora.com.br

## DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa.



## **APRESENTAÇÃO**

O livro “Ensino e pesquisa em bioquímica” apresenta artigos de pesquisa na área de microbiologia, bioquímica, processos bioquímicos e análises clínicas. O e-book contém 8 capítulos, que abordam temas sobre processos fermentativos, atividade antibiótica de extratos naturais, bioacumulação de compostos químicos na fauna, estudos de enzimas associadas a patologias, caracterização química de extratos naturais, aproveitamento de produtos naturais na síntese de compostos químicos de interesse industrial e utilização de softwares para gerenciamento de laboratórios científicos.

Os objetivos principais do presente livro são apresentar aos leitores diferentes aspectos das aplicações e pesquisas em processos bioquímicos, microbiologia e análises clínicas de forma prática, objetiva, atualizada e contextualizada.

Os artigos constituintes da coleção podem ser utilizados para o desenvolvimento de projetos de pesquisa, para o ensino dos temas abordados e até mesmo para a atualização do estado da arte nas áreas descritas.

Após esta apresentação, convido os leitores a apreciarem e consultarem, sempre que necessário, a obra “Ensino e pesquisa em bioquímica”. Desejo uma excelente leitura!

Érica de Melo Azevedo

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO 1..... 1

#### CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTO DOS AMINOÁCIDOS PRESENTES EM FARELO DE ARROZ FERMENTADO COM A LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Rander Lima de Souza

Antônio Zenon Antunes Teixeira

**DOI 10.22533/at.ed.0382112021**

### CAPÍTULO 2..... 9

#### ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITIES HERBÁCIA *ZINGIBER OFFICINALE* IN DENTISTRY: A LITERATURE REVIEW

Natália Franco Brum

Mariana Sobreira Bezerra

Aline Sobreira Bezerra

Gabriela Scortegagna de Souza

Patrícia Koling Marquezan

**DOI 10.22533/at.ed.0382112022**

### CAPÍTULO 3..... 20

#### ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DAS FOLHAS DE *GARCINIA GARDNERIANA* (BACUPARI) COLETADAS EM MINAS GERAIS

Ueveton Pimentel da Silva

Bianca Lana de Sousa

Eduardo Vinícius Vieira Varejão

Gabriela Milane Furlani

Marcelo Henrique dos Santos

**DOI 10.22533/at.ed.0382112023**

### CAPÍTULO 4..... 29

#### CARACTERÍSTICAS ESPECTROFLUORIMÉTRICAS DO SORO DE DUAS ESPÉCIES DE PEIXES NEOTROPICAIS E A INTERAÇÃO COM METILPARATION

Dilson Silva

Frederico Freire Bastos

Madelayne Cortez Moreira

Celia Martins Cortez

**DOI 10.22533/at.ed.0382112024**

### CAPÍTULO 5..... 42

#### ENZIMAS DIGESTIVAS E DISTÚRBIOS FISIOPATOLÓGICOS ASSOCIADOS

Julianna Oliveira de Lucas Xavier

Ana Lúcia Santos de Matos Araújo

Orlando Vieira de Sousa

**DOI 10.22533/at.ed.0382112025**

<b>CAPÍTULO 6.....</b>	<b>59</b>
ESTUDO DE CARBOIDRATOS NA RESINA DE <i>CROTON URUCURANA</i> BAILL	
Sabriny Sousa Araujo	
Antônio Zenon Antunes Teixeira	
DOI 10.22533/at.ed.0382112026	
<b>CAPÍTULO 7.....</b>	<b>68</b>
IMOBILIZAÇÃO DA TANASE DE <i>Aspergillus ochraceus</i> E APLICAÇÃO NA SÍNTESE DE PROPIL GALATO ANALISADA POR ESPECTROMETRIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	
Rayza Morganna Farias Cavalcanti	
Chadia Chahud Maestrello	
Luís Henrique Souza Guimarães	
DOI 10.22533/at.ed.0382112027	
<b>CAPÍTULO 8.....</b>	<b>81</b>
SOFTWARES PARA GERENCIAMENTO LABORATORIAL: O USO DA TECNOLOGIA A FAVOR DA CIÊNCIA E DA COMUNIDADE	
Kely Cristina Mendonça Couto	
Tayara Nataly Lopes Silva	
DOI 10.22533/at.ed.0382112028	
<b>SOBRE A ORGANIZADORA.....</b>	<b>91</b>
<b>ÍNDICE REMISSIVO.....</b>	<b>92</b>

# CAPÍTULO 1

## CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTO DOS AMINOÁCIDOS PRESENTES EM FARELO DE ARROZ FERMENTADO COM A LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Data de aceite: 04/02/2021

**Rander Lima de Souza**

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia/Campus Aparecida de Goiânia/  
Curso – Técnico em Agroindústria,

**Antônio Zenon Antunes Teixeira**

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia/Campus Aparecida de Goiânia/

**RESUMO:** O farelo de arroz contém carboidratos, proteínas, lipídios, fibras, vitaminas e sais minerais. Porém, ele possui enzimas que hidrolisam o óleo aumentando o conteúdo de ácidos livres que promovem a formação de odor e sabor de ranço. Por isso, a fermentação é uma boa alternativa para produzir odor e sabor mais agradável além de enriquecer os substratos com aminoácidos essenciais e proteínas. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a composição dos aminoácidos do farelo de arroz fermentado com *Saccharomyces cerevisiae*. Tratamos os farelos com diferentes concentrações de levedura de 2%, 4% e 6% p/p durante 72 horas. Antes de serem tratadas, as amostras sofreram um pré-aquecimento. Os aminoácidos foram identificados qualitativamente por reação de Sakaguchi, Xantoproteica, Hopkin-Cole e Aminoácidos sulfurados. O farelo não fermentado foi utilizado como controle. As análises de aminoácidos mostraram as presenças de arginina, cisteína, tirosina e aminoácidos essenciais (triptofano e fenilalanina) em farelos fermentados.

Observamos que os aminoácidos arginina e cisteína em concentrações muito inferiores no farelo não fermentado enquanto os aminoácidos tirosina e essenciais (triptofano e fenilalanina) não foram detectados. O aumento dos teores de aminoácidos têm relação positiva com o aumento de levedura adicionada. Com a tecnologia de fermentação poderemos oferecer alternativas de agregar valores nutritivos no produto final aumentando a concentração dos aminoácidos.

**PALAVRAS - CHAVE:** Farelo de arroz, Fermentação, *Saccharomyces cerevisiae*.

**ABSTRACT:** Rice bran contains carbohydrates, proteins, lipids, fibers, vitamins, and minerals. However, it has enzymes that hydrolyze the oil by increasing the content of free acids that promote the formation of odor and rancid taste. Therefore, fermentation is a good alternative to produce a more pleasant odor and taste in addition to enriching the substrates with essential amino acids and proteins. The objective of this work was to characterize the amino acid composition of rice bran fermented with *Saccharomyces cerevisiae*. We treat bran with different yeast concentrations of 2%, 4% and 6% w / w for 72 hours. Before being treated, the samples were preheated. The amino acids were identified qualitatively by the reaction of Sakaguchi, Xantoproteica, Hopkin-Cole and sulfur amino acids. Unfermented bran was used as a control. The amino acid analyzes showed the presence of arginine, cysteine, tyrosine and essential amino acids (tryptophan and phenylalanine) in fermented bran. We observed that the amino acids arginine and cysteine in much lower concentrations in the unfermented

bran while the amino acids tyrosine and essential (tryptophan and phenylalanine) were not detected. The increase in amino acid content has a positive relationship with the increase in added yeast. With fermentation technology we can offer alternatives to add nutritional values to the final product by increasing the concentration of amino acids.

**KEYWORDS:** Rice bran, Fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*.

## INTRODUÇÃO

A fermentação é o processo que converte os carboidratos em álcoois e CO<sub>2</sub> envolvendo atividades dos microrganismos sob condições anaeróbicas. O termo fermentação em estado sólido é definida como o processo de fermentação no qual, os microrganismos crescem em substratos sólidos sem presença de água livre (BHARGAV et al., 2008). Esta tecnologia é uma alternativa para a fermentação líquida ou submersa. Os produtos agroindustriais e seus resíduos são geralmente considerados os melhores substratos para esses processos como arroz, mandioca, farelo de trigo, farelo de arroz etc.

O farelo de arroz, o qual é o dejetado do beneficiamento do grão de arroz ao se produzir arroz polido ou parbolizado apresenta quantidades bastante representativa de carboidratos, proteínas, lipídios, fibras insolúveis, vitaminas e sais minerais (LACERDA et al., 2010). A estrutura desse material tem como seus principais componentes celulose, hemicelulose, lignina, amilopectina e proteínas, o que caracteriza como materiais extremamente heterogêneos, e que servem como fonte de carbono, energia e de suporte para o crescimento microbiano (PANDEY, 2003). Porém, o farelo de arroz é pouco utilizado na alimentação humana porque ele possui enzimas que hidrolisam o óleo aumentando o conteúdo de ácidos graxos livres, mono e diacilglicerídeos que promovem a formação de odor e sabor de ranço (GLUSHENKOVA et al., 1998). Por isso, a fermentação do farelo pode ser uma boa alternativa biotecnológica.

Esse processo pode tornar os alimentos mais nutritivos, por aumentar a digestibilidade e a palatabilidade, com um odor mais agradável (FEDDERN et al., 2007). Segundo Steinkraus (1997), a tecnologia de fermentação também tem função de enriquecimento de substratos de alimentos com proteínas e aminoácidos essenciais. Os aminoácidos são utilizados pelas células para a biossíntese das proteínas. Esses aminoácidos apresentam as características estruturais diferentes que permitem as proteínas desempenharem funções diferentes nos organismos dos seres vivos. Existem aminoácidos essenciais (que organismo não sintetiza e que precisam ser fornecido pelos alimentos) e aminoácidos não-essenciais (que organismo consegue produzir). E as leveduras se destacam como uma excelente fonte de proteínas.

Algumas pesquisas sobre a fermentação em estado sólido são o enriquecimento proteico, onde microrganismos selecionados aumentam o teor proteico de resíduos agroindustriais, de modo a serem utilizados na alimentação humana ou animal; a detoxificação de resíduos, por meio da eliminação de substâncias recalcitrantes que

impedem sua aplicação intensiva; e a produção de compostos de alto valor agregado, como enzimas e diferentes metabólitos (RAIMBAULT, 1998; PANDEY, 2003; PINTO, 2005). Diferentes tipos de microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem crescer em substrato sólido (AIDO et al., 1982). *Penicillium decumbens* e *Rhizopus oligosporus* são utilizados para enriquecimento proteico em substratos de palha de milho e farinha de colza (*Brassica napus*) enquanto *Rhizopus oryzae* é utilizada para produção de enzimas em substrato de farelo de trigo (PINTO, 2005).

*Saccharomyces cerevisiae* é a levedura utilizada na produção do pão, da cerveja e de etanol. Ela é o microrganismo atrativo para a produção comercial de proteína em virtude de fácil propagação e de não terem relação patogênica com o homem (PARK; RAMIREZ, 1989). Alguns estudos apontam enriquecimento proteico em fermentação sólida utilizando dessa levedura em palma forrageira (ARAUJO et al., 2005), mandioca (BOONNOP et al., 2009) e talo de milho (DARWIS et al., 2012). Esse trabalho tem o objetivo de caracterizar a composição dos aminoácidos do farelo de arroz fermentado com levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Processo de Fermentação

O farelo de arroz foi obtido fresco da Cristal Arroz em Aparecida de Goiânia. As amostras antes de serem tratadas sofreram um pré-aquecimento de 100°C por 1 hora. Para a geração de biomassa foi utilizado a metodologia padronizada por Oliveira et al. (2009), que consistiu em adicionar ao substrato, solução nutriente na proporção de 50 mL para 100 g de levedura de *Saccharomyces cerevisiae* nas concentrações de 2%, 4% e 6% p/p. Os reatores (glass incubator) forão em seguida armazenados em ambiente seco a 30°C por 72 horas, sendo as amostras retiradas nos tempos 72h para análises.

### Preparação da Solução de Amostras

Cada uma das amostras foi colocada num frasco volumétrico de 50 mL, 0,25g de amostra, 20 mL de água destilada e exatamente 5 mL de solução de NaOH 0,1N. Agitado até dissolução completa da amostra e, então, adicionou-se exatamente 5 mL de ácido acético 1N e completou-se o volume com água destilada.

### Caracterização de Aminoácidos

- a. Reação de Sakaguchi: pipetou-se em tubo ensaio 1 mL de solução de amostra e adicionou-se 10 gotas de NaOH 2,5N, 2 gotas de  $\alpha$ -Naftol à 1% e 1 mL de Hipoclorito de sódio. O aparecimento de cor vermelha foi característica de grupo guanidina da arginina.



b. Reação de Xantoproteica: em tubo de ensaio, pipetou-se 1 mL de solução de proteínas, juntou-se 10 gotas de ácido nítrico concentrado e ferveu-se. Acrescentou-se em seguida, 4 mL de NaOH à 20%. O aparecimento de cor vermelha, indicou a presença de tirosina, triptofano e fenilalanina.

c. Reação para aminoácidos sulfurados: pipetou-se em um tubo de ensaio, 1 mL de solução de amostra e adicionou-se 2 mL de NaOH 2,5N e ferveu-se por 1 min. Adicionamos 5 gotas de Acetato de Chumbo à 5% e ferveu-se durante 20 a 30 segundos. A formação de precipitado fino, castanho ou preto de sulfato de chumbo indicou a presença de cisteína e da cistina.

d. Teste de Hopkin-Cole é um teste para compostos contendo o grupo índole (por exemplo, triptofano). Em tubo de ensaio pipetou-se 1 mL de solução de amostra e 3 mL do reativo de Hopkins-Cole. Inclinou-se o tubo e deixamos cair lentamente no fundo do tubo 2 mL de ácido sulfúrico concentrado, agitado gentilmente. O aparecimento de um anel púrpura na interface, constituiu teste positivo. Reagente de Hopkin-Cole: colocou-se de 10 g de Mg em pó num Erlenmeyer, adicionamos água até cobrir o metal, adicionou-se com agitação de 250 mL de solução aquosa saturada de ácido oxálico, filtrado, acidificado com ácido acético diluído e diluído a 1 L com água destilada.

Os métodos de identificação de aminoácidos foram adotados de Nascimento et al. (1987) e Lopes (2007).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os aminoácidos são as subunidades de proteínas e peptídios e, portanto, são considerados os blocos de construção da vida. Os aminoácidos podem ser produzidos por microorganismos utilizando várias fontes de carbono. O método de fermentação é uma alternativa para a produção de aminoácidos utilizando o fato de que os microorganismos convertem nutrientes em vários componentes vitais necessários para si mesmos. Com esse método, as matérias-primas como açúcares são adicionadas ao meio de cultura de microorganismos, e os microorganismos que proliferam podem produzir aminoácidos. E os fungos tornam-se uma alternativa para enriquecimento de nutrientes de substratos por sua versatilidade de crescimento.

Para a identificação qualitativamente de aminoácidos pode-se utilizar uma variedade de reagentes, que formam produtos coloridos com os diferentes aminoácidos. Na Tabela 1 são apresentando a presença de aminoácidos determinados qualitativamente em farelos de arroz fermentados. Os resultados apontaram que os farelos fermentados contêm os aminoácidos dos grupos aromáticos como tirosina, triptofano e fenilalanina, além de arginina e cisteína. Na reação de Sakaguchi que identifica arginina, o grupo guanidino da arginina em meio alcalino reage com  $\alpha$ -naftol e hipoclorito de sódio gerando um produto de cor vermelha. Na reação Xantoproteica, os aminoácidos tirosina, triptofano e fenilalanina,

os quais contêm anéis benzênicos substituídos e tais compostos químicos reagem com o ácido nítrico concentrado formando compostos nitrosos que são fortemente coloridos em meio alcalino produzindo uma cor vermelha. A reação de Hopkins-Cole detectou a presença de triptofano, na qual em presença de ácidos, muitos aldeídos se condensam com o anel indólico do triptofano. As proteínas que contêm triptofano reagem com o ácido glicoxílico e pela adição do ácido sulfúrico produzirá cor púrpura (violeta) na interface. Na reação para aminoácidos sulfurados, o aquecimento das proteínas em meio alcalino resulta na liberação do enxofre da cisteína e cistina, sob a forma de sulfato. O sulfato é evidenciado pela adição de acetato de chumbo, dando precipitado castanho ou preto de sulfato de chumbo (LOPES, 2007).

Reações	Aminoácidos caracterizados	Controle	Farelos fermentados com:		
			2%	4%	6%
Sakaguchi Xantoproteica	Arginina	± (Traços)	++	+++	++++
	Tirosina, triptofano e fenilalanina	-	+	++	+++
Hopkin-Cole	Triptofano	-	+	++	+++
Aminoácidos sulfurados	Cisteína	± (Traços)	++	+++	++++

Tabela 1: Caracterização de aminoácidos em farelos de arroz fermentados com *Saccharomyces cerevisiae*, farelo não fermentado serve como controle

Obs. + fracamente poitivo, ++ positivo, +++ fortemente positivo e ++++ extremamente positivo.

Em comparação com os farelos fermentados, o farelo de controle apenas contém traços de arginina e cisteína. Estudo semelhante demonstrou que as fermentações de farelo de trigo com *Rhizopus sp.* e *Aspergillus oryzae* por 72 horas aumentaram significativamente os teores de aminoácidos totais, aminoácidos digeríveis e metionina disponíveis (SILVEIRA; FURLONG, 2007).

Os aminoácidos fenilalanina e triptofano são aminoácidos essenciais. A arginina é também considerada como aminoácido essencial para indivíduos jovens e em crescimento, mas não para adultos (NELSON; COX, 2002). Os aminoácidos são imperativos para sustentar a saúde do corpo humano, se os aminoácidos forem deficientes, a síntese protéica não ocorre. A tabela 2 mostra os funções de aminoácidos encontrados em farelos fermentados (Tabela 2).

Em relação com os teores de aminoácidos presentes em farelos fermentados, o conteúdo de aminoácidos tratados com 6% de levedura apresentou maiores concentrações nas análises qualitativa (as cores mais intensas detectaram fortemente positivo e extremamente positivo). Analisando os teores de aminoácidos entre os três tratamentos

diferentes, pôde-se observar que o aumento dos teores de aminoácidos tem relação com o aumento da levedura adicionada. Geralmente, os microorganismos produzem os 20 tipos de aminoácidos apenas nas quantidades necessárias para si mesmos. Eles têm um mecanismo para regular as quantidades e qualidades das enzimas produzindo aminoácidos somente nas quantidades necessárias (IVANOV, 2013). Vale ressaltar que a composição do farelo de arroz varia dependendo do tipo de arroz e das técnicas de moagem utilizadas. Além disso, o tempo de fermentação foi um fator necessário para a produção de aminoácidos e síntese de proteína. Segundo Silveira e Furlong (2007), o aumento de produção de aminoácidos ocorreu ao longo da fermentação, alcançando seu máximo em 72 horas.

Aminoácidos	Funções
Arginina	Atuar como principais neurotransmissores excitatórios, aumenta a resistência e diminui a fadiga, desintoxica produtos químicos nocivos, e envolvido na síntese do DNA.
Cisteína	Proteção contra radiação, poluição e luz ultravioleta, desintoxicação, nutrição para o crescimento e reparação da pele.
Fenilalanina	Aumenta a memória e o aprendizado.
Tirosina	Precursor da dopamina, norepinefrina e adrenalina, melhora a clareza mental e a concentração, diminui as depressões.
Triptofano	Ajuda efetiva ao sono devido à conversão em serotonina, reduz a ansiedade e algumas formas de depressão, trata enxaquecas e estimula o hormônio do crescimento

Tabela 2: As funções de aminoácidos encontrados em farelos de arroz fermentados com *S. cerevisiae*

Fonte: \_\_\_\_\_. Amino acids. Disponível em: <http://www.aminoacidsguide.com/>

## CONCLUSÃO

A fermentação do farelo de arroz utilizando a levedura *S. cerevisiae* produziu um produto mais nutritivos que contém aminoácidos arginina, cisteína, fenilalanina, tirosina e triptofano. Enquanto o farelo não fermentado contém apenas os traços de arginina e cisteína. Os teores de aminoácidos foram aumentando nos farelos fermentados em relação ao farelo controle sem fermentação e com o aumento da levedura adicionada. Maiores foram os teores de aminoácidos encontrados e o maior aumento foi no farelo tratado com 6% de leveduras.

A tecnologia de fermentação é um processo de sustentabilidade que promove as vantagens econômicas e ecológicas com processo simples de uso de fontes de carbonos barata como os produtos agroindustriais e seus resíduos.

## REFERÊNCIAS

\_\_\_\_\_. Amino acids. Disponível em: <http://www.aminoacidsguide.com/>. Acesso em: 20/06/2017.

AIDO, K.E.; HENDRY, R.; WOOD, B.J.B. Solid substrate fermentation. *Adv. Appl. Microbiol.*, v.28, p. 201-238, 1982.

ARAUJO L.F.; MEDEIROS, A.N.; NETO, A.P.; OLIVEIRA, L.S.C.; SILVA, F.L.H. Protein Enrichment of Cactus Pear (*Opuntia ficus – indica* Mill) Using *Saccharomyces cerevisiae* in Solid-State Fermentation. *Braz. Arch. Biol. Tech.*, v.48, p.161-168, 2005.

BHARGAV, S.; PANDA, B.P.; ALI, M.; JAVED, S. Solid-state Fermentation: An overview. *Chem. Biochem. Eng. Q*, v.22, n.1, p.49–70, 2008.

BOONNOP, K.; WANAPAT, M.; NONTASO, N.; WANAPAT, S. Enriching nutritive value of cassava root by yeast fermentation. *Sci. Agri. (Piracicaba, Braz.)*, v.66, p.629-633, 2009.

DARWISH, G.A.M.A.; BAKR, A.A.; ABDALLAH, M.M.F. Nutritional value upgrading of maize stalk by using *Pleurotus ostreatus* and *Saccharomyces cerevisiae* in solid state fermentation. *Annals of Agricultural Science*, v.57, n.1, p.47-51, 2012.

FEDDERN, V.; FURLONG, E.B.; SOARES, L.A.S. Efeitos da fermentação nas propriedades físico-químicas e nutricionais do farelo de arroz. *Ciê. Tecnol. Aliment.*, v.27, n.4, p.800-804, 2007.

GLUSHENKOVA, A. I.; UL'CHENKO, N. T.; TALIPOVA, M.; MUKHAMEDOVA, KH.S.; BEKKER, N. P.; TOLIBAEV L. Lipids of rice bran. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 34, n. 3, p. 275 – 277, 1998.

IVANOV, K.; STOIMENOVA, A.; OBRESHKOVA, D.; SAO, L. Biotechnology in the Production of Pharmaceutical Industry Ingredients: Amino Acids,

*Biotechnology & Biotechnological Equipment*, v. 27, n. 2, p. 3620-3626, 2013.

LACERDA, D.B.C.L.; SOARES JUNIOR, M.S.; BASSINELLO, P.Z.; CASTRO, M.V.L.; LOBO, V.L.S.; CAMPOS, M.R.H. e SIQUEIRA, B.S. Qualidade de farelos de arroz cru, extrusado e parbolizado. *Pesquisa Agropecuária Tropical. Goiânia*. v. 40, n.4, p. 521-530, 2010.

LOPES, C.F. *Bioquímica: Roteiro de aulas práticas*. Cuiába: UFMT, 2007.

NASCIMENTO, A.J.; CAMPELLO, A.P.; VIANNA, C.H.M.; AMARAL, D.A.F.; CARNIERI, E.G.S.; et al. *Bioquímica: Aulas práticas*. Curitiba: Cientia et Labor, Editora da UFPR, 1987.

NELSON, D.L.; COX, M.M. *Lehninger Princípios de Bioquímica*. São Paulo: Sarvier, 2002.

PARK, S.; RAMIREZ, W.F. Dynamics of foreign protein secretion from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, v.33, p.272, 1989.

PANDEY, A. Solid state fermentation. *Biochem Eng J.*, v.13, n.2/3, p.81-84, 2003.

PINTO, G.A.S.; BRITO, E.S.; ANDRADE, A.M.R.; FRAGA, S.L.P.; TEIXEIRA, R.B. *Fermentação em estado sólido: Uma aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais*. Comunicado Técnico, n.102, 2005. Disponível em: [https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Fermentacao-alternativa-para-o-aproveitamento-e-valorizacao-de-residuos-agroindustriais-tropicais\\_000fderll5t02wx5eo0a2ndxyz40jpmmp.pdf](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Fermentacao-alternativa-para-o-aproveitamento-e-valorizacao-de-residuos-agroindustriais-tropicais_000fderll5t02wx5eo0a2ndxyz40jpmmp.pdf). Acesso em: 18/03/2016.

RAIMBALT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Elec. J. Biotech.*, v.1, n.3, 1998.

SILVEIRA, C.M.; FURLONG, E.B. Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.27, n.4, p.805-811, 2007.

STEINKRAUS, K.H. Classification of fermented foods: Worldwide review of household fermentation techniques. *Food Control*, v.8, n.5(6), p.311-317, 1997.

# CAPÍTULO 2

## ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITIES HERBÁCIA *ZINGIBER OFFICINALE* IN DENTISTRY: A LITERATURE REVIEW

Data de aceite: 04/02/2021

Data de submissão: 26/11/2020

### Natália Franco Brum

Universidade Federal de Santa Maria, Curso de  
Odontologia  
Santa Maria - Rio Grande do Sul - Brasil  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6510-8889>

### Mariana Sobreira Bezerra

Universidade Federal de Santa Maria, Curso de  
Odontologia  
Santa Maria - Rio Grande do Sul - Brasil  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2868-2974>

### Aline Sobreira Bezerra

Universidade Federal de Santa Maria,  
Departamento de Ciência e Tecnologia em  
Alimentos  
Santa Maria - Rio Grande do Sul - Brasil  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1370-9564>

### Gabriela Scortegagna de Souza

Universidade Federal de Santa Maria, Curso de  
Odontologia  
Santa Maria - Rio Grande do Sul - Brasil  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0286-493X>

### Patrícia Kolling Marquezan

Universidade Federal de Santa Maria,  
Departamento de Microbiologia e Parasitologia  
Santa Maria - Rio Grande do Sul - Brasil  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5061-6039>

problem, since it contributes to the development of oral and bodily diseases. In this sense, Dentistry stands out for expanding knowledge about the oral ecosystem and performing procedures aimed at reducing its pathogenicity and improving oral health. Thus, technological advances and indiscriminate application of antibiotics have made bacterial strains resistant, with a great search for safer, more natural and effective methods. Therefore, the use of plants for healthy treatments is an area of great study in Dentistry. In the present literature review, we sought to analyze the species *Zingiber officinale* with its antimicrobial and antibiofilm activity. For this study, materials were searched at the BIREME, CINAHL, Cochrane Library, Embase, Google Scholar, PubMed, Science Direct, published until August 2020. The search for the articles was carried out in August 2020, of the 3,401 studies were refined in 18. The findings showed that the plant *Zingiber officinale* has the capacity to inhibit certain bacteria *in vitro*, such as *Bacillus sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans* and fungi, like *Candida albicans*. Thus, studies in the area are still needed in order to prove its effectiveness *in vivo*, to analyze the toxicity, drug interactions and side effects of the plant.

**KEYWORDS:** Antibacterial agents; Antifungal agents; Dental biofilm; *Zingiber officinale*.

**ABSTRACT:** The pathogenic dental biofilm formed by species presents itself as a serious



## ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIFÚNGICA DA HERBÁCIA *ZINGIBER OFFICINALE* EM ODONTOLOGIA: UMA REVISÃO DE LITERATURA

**RESUMO:** O biofilme dentário patogênico formado por espécies bacterianas e fúngicas e contribui para desenvolvimento doenças orais e corpóreas. Nesse sentido, a odontologia por ampliar o conhecimento sobre o ecossistema oral e realizar procedimentos que visam à reduzir a patogenicidade e melhorar a saúde oral. Assim, os avanços tecnológicos e a aplicação indiscriminada de antibióticos tem tornado as cepas bacterianas resistentes, sendo grande a busca por métodos mais seguros, naturais e eficazes. Logo, o uso de plantas aos tratamentos saudáveis é uma área de grande estudo em Odontologia. Na presente revisão de literatura, buscou-se analisar a espécie *Zingiber officinale* e a atividade antimicrobiana e antibiofilme. Para tal estudo, buscaram-se materiais na Biblioteca Regional da Medicina (BIREME), CINAHL, Cochrane Library, Embase, Google Scholar, PubMed e Science Direct publicados até agosto de 2020. A busca dos artigos foi realizada em agosto do mesmo ano, e dos 3.401 estudos foram refinados em 19. Os achados mostraram que a planta *Zingiber officinale* tem capacidade de inibir certas bactérias *in vitro*, como *Bacillus* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans* e fungos, como *Candida albicans*. Dessa forma, ainda são necessários estudos na área, a fim de comprovar sua eficácia *in situ* e *in vivo*, analisar a toxicidade, interações medicamentosas e efeitos colaterais da planta.

**PALAVRAS - CHAVE:** Agentes antibacterianos; Agentes antifúngicos; Biofilme dentário; *Zingiber officinale*.

### 1 | INTRODUCTION

Many people are unknow of the importance of the oral cavity for general health. From the mouth, many microorganisms develop and proliferate, reaching the rest of the body. Thus, multiple infectious diseases caused by microbiological dysbiosis can be prevented through daily oral health care, through correct oral hygiene. In this sense, the imbalance of the oral ecosystem as well as the structuring in pathogenic biofilms enable greater bacterial virulence and resistance to antimicrobials (Marsh & Martin, 2018).

Over time, there were many technological changes that aimed at improving drugs, with an increase in the spectrum of action and reduction of side effects, but that maintained the biostatic and biocidal performance. With this perspective, Phytotherapy has presented itself as a viable option, as it provides therapies based on natural compounds, such as plants and their components, seeking to inhibit bacterial virulence mechanisms or cause them to develop more slowly (Grégio et al., 2006; Park et al., 2008; Gull et al., 2012; Kumar et al., 2013; Hasan et al., 2015; Jain et al., 2015; Aghazadeh et al., 2016; Avcioglu et al., 2016; Jami et al., 2017; Lee et al., 2018; Rampogu et al., 2018).

In the present work, the *Zingiber officinale* plant was chosen, which although originate in Asia (Ghasemzadeh et al., 2018) has proliferated in the world, becoming easily accessible in Brazil. In this sense, its effects of therapeutic importance are overlooked, since it is known worldwide for its use in the food industry. It was found that its constituents, such as rhizome

extract (stem extension) and phenols (gingerol and shogaol), have pharmacological functions, as they act in addition to antiemetics, anti-inflammatory and thermogenic, such as antibacterials and antifungals, being non-genotoxic (Grégio et al., 2006; Gull et al., 2012; Kumar et al., 2013; Valera et al., 2016; Guo et al., 2017; Cavalcante, 2019).

From this perspective, the objective of this work was to investigate the antibacterial and antifungal activity of *Zingiber officinale* in the existing literature, focusing on activities of interest in Dentistry.

## 2 | METODOLOGY

The literature review followed the precepts of the integrative study with a qualitative method. This design provides through a bibliographic search in books and scientific articles on the subject, the synthesis of knowledge to show future perspectives and incorporation of the applicability of the results (Pereira et al., 2018). Different searches were carried out in the month of August 2020, including articles that addressed the plant's antibiofilm or antibacterial properties, published in the last 15 years. Literature reviews and case reports were excluded, as well as studies that did not address the theme of the present study.

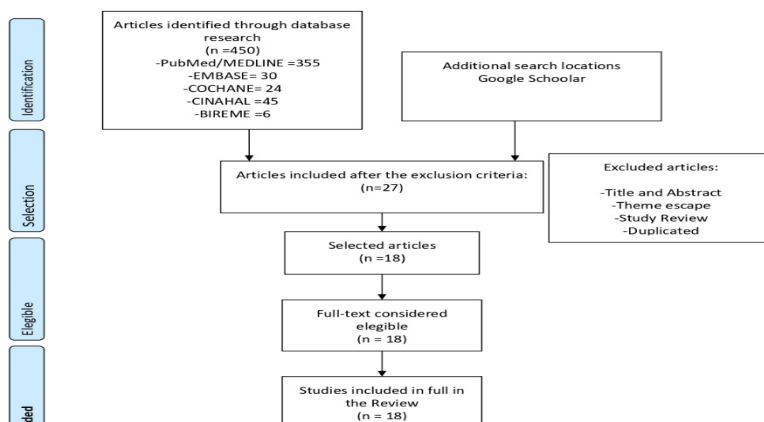
Electronic searches were performed in the period from August and September 2020 in the PubMed / MEDLINE, Embase, Cochrane Library, CINAHL and Science Direct databases for articles published until August 2020, in addition to complementary tracking in Google Scholar and in the reference lists of the articles included in the review.

In the PUBMED database, the first research was carried out by combining the MeSH descriptors: "Anti infective agents", "Antifungal agents", "Dentistry" and "Periodontal disease" and its derivatives, together with the keyword "*Zingiber officinale*" and synonyms joined with Boolean operator "AND". In total, 392 articles were found for further analysis of the title and abstract.

In another database, EMBASE, with the Entree descriptors, found 30 articles, in COCHRANE, 24 articles; BIREME, 6 studies and CINAHL 45 articles to be selected later. Finally, the last search was carried out on Google Scholar and references of the selected articles, to complement the study.

The flowchart (Figure 1) presented, describes the number of articles found, how many excluded by the exclusion criteria (escape from the topic, duplicate or papers older than 20 years, case reports and literature review) until reaching the articles included in the review of literature. Following criteria in the selection of studies generates better reliability and generalizability of the study's conclusions.

Figure 1: Flowchart of study selection



Source: Authors (2020)

## 31 RESULTS

After a critical reading of titles, abstracts and removal of duplicates, of the 3,401 articles found, 18 studies were selected that met the inclusion criteria. Following up on this screening, their full assessments were made, aiming to define the most considerable points to be analyzed and reflected.

The methodological process of organizing the included articles is shown in Table 1, where the extracts used stand out. All studies were *in vitro* and there are publications in three languages (English, Portuguese and Spanish). In addition, there were tests with various microorganisms as well as with various properties of the plant.

Title:	Author	Journal	Methodology	Microorganism	Considerations
1. Ação Antimicrobiana de <i>Zingiber officinale</i> frente a micro-organismos	GREGIO et al., (2006)	Estudos de Biologia	Study in vitro	<i>Candida albicans</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus mutans</i>	There was antimicrobial activity, with extract hydroalcoholic and glycolic) of <i>Zingiber officinale</i> with the tested bacteria.
2. Antibacterial Activity of [10]-Gingerol and [12]-Gingerol Isolated from Ginger Rhizome Against Periodontal Bacteria.	PARE, BAE, LEE, (2008)	Phytotherapy Research	Study in vitro	<i>Prevotella intermedia</i> , <i>Porphyromonas endodontalis</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i>	Ginger presents polyphenolic ketones and alkylated gingers (both in its ethanol extract and in n-hexane), which provided antibacterial activity to the tested gram-negative bacteria.
3. Antibacterial effect of <i>Althaea sarawak</i> cloves and <i>Zingiber officinale</i> rhizomes against multiple-drug resistant clinical pathogens.	KARUPPIA II, RAJARAM., (2012)	Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine	Study in vitro	<i>Bacillus</i> , <i>Enterobacterium</i> sp., <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella</i> sp., <i>Proteus</i> sp., <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	The ethanolic extract of the rhizome of <i>Zingiber officinale</i> act with antibacterial and antifungal functions. This was effective for the bacteria tested, with greater results for <i>Bacillus</i> sp.
4. Antibiofilm effects of <i>Citrus limonium</i> and <i>Zingiber officinale</i> Oils on biofilm formation of <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> and <i>Klebsiella terrigena</i> species.	AVCIOGLU SAHAI, III KAY., (2016)	African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines	Study in vitro	<i>Klebsiella (Klebsiella) ornithinolytica</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Klebsiella terrigena</i>	The Ginger oil inhibited biofilms formed by the species <i>Klebsiella</i> , because it consists of monoterpenes, causing disruption in the cell membrane of such bacteria. It has ample medicinal potential to fight infectious diseases, but research and testing in vivo are necessary.
5. Antibiofilm and Antivirulence of 6-Gingerol and 6-Shogaol Against <i>Candida albicans</i> Bio to Inhibition.	LEE et al., (2018)	Frontiers in Cellular and Molecular Microbiology	Study in vitro	<i>Candida albicans</i>	Ginger components, such as 6-gingerol and 6-shogaol, have antibiofilm and antivirulence capabilities (such as interaction with genes), thus inhibiting fungal biofilms formed by <i>Candida albicans</i> , resistant to drugs.
6. Ação de cloresedina, zingiber officinale and eugenol isolados em <i>Candida albicans</i> , <i>enterococcus faecalis</i> , <i>escherichia coli</i> ANT (ND) EUSIN IN THE CANALS. ROOT	VALEIA et al.,(2016)	The Journal of Contemporary Dental Practice	Study in vitro	<i>Candida albicans</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	The extract of <i>Zingiber officinale</i> demonstrates good antimicrobial potential. When used together with Chlorhexidine, it presents excellent antimicrobial potential (antibacterial and antifungal), with the tested species. Essential oils of this plant, gingerol and shogaol, that function as anti-inflammatory and analgesics.
7. Eficacia antimicrobiana del extracto de aceite esencial de gengibre ( <i>Zingiber officinale</i> )	JAMI, ARAUJO., (2017)	ODONTOLOGIA	Study in vitro	<i>Enterococcus faecalis</i>	Ginger's antimicrobial action is equivalent to its concentration. Therefore, the higher concentration used in the study (1.5% of its hydroalcoholic extract), it was possible to minimize the gram-positive

sobre cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> em biofilmes.						<i>Enterococcus faecalis</i> , being a possible therapeutic agent in combating biofilms and dental caries.
8	Formation of 6-, 8- and 10-membered rings through Application of Different Drying Methods: Antioxidant and Anticorrosion Activity	CHASEMZ ADRI <i>et al.</i> , (2018)	Molecules	Study in vitro	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Candida albicans</i> spp., <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>Micromonospora purpurea</i> , <i>Paraphomonas aeruginosa</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> .	Ginger extract shows better results for gram-positive bacteria, such as <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Enterococcus faecalis</i> . It works as an antifungal to <i>Candida albicans</i> , having better results than the use of acetic acid. As essential factors to these performance, the flavonoids shogaols stand out.
9	Ginger ( <i>Zingiber officinale</i> ) phytochemicals and gingerol-α and gingerol-β: molecular dynamics simulations and in vitro approaches.	RAMPOLU <i>et al.</i> , (2018)	Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials	Study in vitro	<i>Staphylococcus aureus</i>	In vitro tests with gingerone-α and shogaol, derived from Ginger oil, they were able to react more strongly than some drugs with the surface of the investigated bacterial enzyme, inhibiting the formation of biofilms.
10	Ginger Inhibits Biofilm Formation by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14.	KIM, PARK, (2013)	PLOS ONE	Study in vitro	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14	Ginger extract inhibits the development of biofilms formed by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14, affecting bacterial virulence mechanisms. It acts in the transduction of bacterial signals, reduces cellular cAMP and the production of EPS, in addition to promoting bacterial shedding without affecting its growth.
11	Inhibitory effect of Allicin solvent and <i>Zingiber officinale</i> extract on <i>Escherichia coli</i> important drug resistant pathogenic bacteria.	OTTE <i>et al.</i> , (2012)	Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials	Study in vitro	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> e <i>Shigella sonnei</i> .	Ginger presents itself as a spice that can be used to fight infectious diseases, but studies in this area are still scarce. Despite this, in an experiment, <i>Escherichia coli</i> and <i>Shigella sonnei</i> were used, the extract with ethanol and methanol, respectively, present in the essential oil of Ginger, the bacterial and fungal inhibition.
12	Inhibitory effect of <i>Zingiber officinale</i> towards <i>Streptococcus mutans</i> virulence and caries development in <i>in vivo</i> studies	HASAN <i>et al.</i> , (2015)	BMC Microbiology	Study in vitro e <i>in vivo</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Zingiber officinale</i> , both in the form of crude extract and methanolic fraction, is able to alter the physiological structure of the dental biofilm formed by <i>S. mutans</i> . Consequently, it inhibits bacterial growth and virulence mechanisms of this strain, even acting as a possible anticariogenic agent.
13	In vitro activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible <i>Candida</i> spp.	POZZATI <i>et al.</i> , (2008)	Canadian Journal of Research	Study in vitro	<i>Candida</i> spp ( <i>Candida albicans</i> , <i>Candida dublinensis</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida krusei</i> e <i>Candida tropicalis</i> )	The essential oil of Ginger has antifungal activity against <i>Candida</i> spp. The main compound of this, responsible for this, is the Zingiberene. However, when compared to Oregano essential oil, it presents less response.
14	Natural products and polyorbates: Potential Inhibitors of biofilm formation in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	MITARI <i>et al.</i> , (2020)	The Journal Of Infection In Developing Countries	Study in vitro	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ginger contains phenolic compounds, which block bacterial virulence mechanisms of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
15	Survey of the Antibiofilm and Antimicrobial Effects of <i>Zingiber officinale</i> (In Vitro Study).	AGHAZAD, EH <i>et al.</i> , (2016)	Jundishapur Journal of Microbiology	Study in vitro	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Candida</i> sp., <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	Ginger extract works as an antifungal to strains, such as <i>Candida albicans</i> and <i>Candida krusei</i> , having better results than the use of some antimicrobials, such as Fluconazole. In addition, it presented good performance to <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Staphylococcus aureus</i> , acting as antibacterial and antibiofilm.
16	Two new monoterpene glycosides from the fresh rhizome of Tongling White Ginger ( <i>Zingiber officinale</i> ).	GUO <i>et al.</i> , (2017)	Natural Product Research	Study in vitro	<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i>	The monoterpenoids (glycosides 3-6), present in the formation of the rhizome of <i>Zingiber officinale</i> managed to react (as antimicrobials) against the tested bacteria.
17	Use of Traditional Indian Plants in the Inhibition of Caries-Causing Bacteria – <i>Streptococcus mutans</i> .	JAIN <i>et al.</i> , (2015)	Brazilian Dental Journal	Study in vitro	<i>Streptococcus mutans</i>	Ginger extract has good activity against the species: <i>Streptococcus mutans</i> , which is the main responsible for dental caries.
18	Zingerone inhibit biofilm formation and improve antibiofilm efficacy of 2 ciprofloxacin against <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1.	KUMAR, CHHIBBER, ; HAJRAL, (2013)	Fitoterapia	Study in vitro	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	The use of Zingerone, obtained by Ginger, acts as an antibacterial to <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and, consequently, antibiofilm, as it acts on pili type IV and flagella (virulence mechanisms of this strain).

Table 1 - Detailed analysis of publications

Font: Own Authors, 2020

## 4 | DISCUSSION

The species *Zingiber officinale* Roscoe, coming from the family Zingiberaceae is popularly known as “Ginger”, “Gingivre” or “Mangarataia” and originates in Asia, measuring approximately 80 centimeters (herbaceous) (Karupiah et al, 2012; Cavalcante, 2019). It is coated with a rough epidermis and has a yellowish color, such tuberous root consisting of the rhizome (underground stem), elongated and flattened, which contains applications in the food and pharmaceutical industry, as it contains essential oils (borneol, camphene, cineole, citral, falandreno, gingerols, shogaols and zingiberene), which give its refreshing essence and carbohydrates. (Cavalcante, 2019). Thus, such a plant is classified as Nutraceutical,

as it contains aspects in addition to nutritional, medicinal, with health benefits, without side effects (Rampogu et al., 2018). However, little is known about its application and systemic action, as in the oral cavity, and studies on its uses are essential. Its composition is shown in table 2.

TABLE 2- COMPOSITION OF THE ZINGIBER OFFICINALE PLANT

CONSTITUTION:	<i>Zingiber officinale</i>
<b>Essencial:</b>	Borneol; cineol; citral; d-canfeno; felandreno; gingerol; zingibereno.
<b>Mucilage</b>	
<b>Essencial oil (Gingerol).</b>	Canfeno; felandreno; zingerona; zingibereno.
<b>Resin (almidon).</b>	
<b>Phenolic substance.</b>	Borneol; cineol; citral; felandreno; limoneno; zingibereno.
<b>Fatty acids.</b>	
<b>Aminoacids.</b>	
<b>Enzyme:</b>	Zingibaina
<b>Mineral salts</b>	

Basead: CAVALCANTE, R. AS PLANTAS NA ODONTOLOGIA: um guia prático. Rio Branco, Ac: [s.n], 2019.575 p. il.

In this table is possible analyze the plant compounds that are used in research and that have antimicrobial properties, such as gingerol, felandreno, zingibereno presentes in that essential composition of the plant.

In addition to the exposed compounds, ginger is also important because it contains sugars, carbohydrates, proteins, B vitamins and vitamin C, which help the immune system to function properly and, consequently, to prevent diseases (Cavalcante, 2019).

Initially, it came from Southeast Asia, as a spice, and it was only in the 16th century that it was established in South America, based on Portuguese conquerors (Karuppiah and Rajaram, 2012). Although not native to Brazil, it is widely used. Ginger belongs to 66 plants with anti-inflammatory, antiseptic, diuretic, thermogenic, sialogogue and even anti-ulcerogenic activity, based on its compound, (+) - angelicoidenol-2-obD-glucopyranoside, according to ANVISA nº 10 / 2010 (Cavalcante, 2019).

The way of use occurs through poultices, rinses and tinctures, ingestion of mouth lozenges, shavings, teas, syrups and even, through physiological procedures, such as chewing. All the processes listed are aimed at improving oral hygiene, preventing bad breath and oral wounds. In addition, the herbaceous stimulates the Central Nervous, Cardiovascular and Gastrointestinal System, exercising important pharmacological functions when used according to the recommended therapeutic dosages, as there are contraindications such as heart failure patients (Cavalcante, 2019).

The greatest constitution of ginger is made by alcoholic compounds, such as ethanols, phenols and methanols, in addition to sesquiterpenoids in their essential oil (1-3%), such as gingerols, shogaol, proanthocyanins, condensed tannins curcumin, farnesene and zingiberene (volatile or not), which are related to antibacterial, antifungal and antibiofilm and analgesic activity (depending on the plant, which are extracted) (Grégio et al., 2006; Park et al., 2008; Gull et al., 2012; Jain et al., 2015; Guo et al., 2017; Cavalcante, 2019).

*In vitro* studies by Gull et al., (2012) and Karupiah & Rajaram (2012) found an inhibitory effect of the plant on the bacterium *Escherichia coli* (bacteria belonging to the normal intestinal microbiota and causing eventual infections). The (hydro) alcoholic extracts were active (Grégio et al., 2006; Valera et al., 2016), as well as components of the essential oil (zingiberone-A and shogaol) that interacted with the active site of the enzyme 6-hydromethyl-7,8-di-hydropterin pyrophosphokinase (SAHPPK) of the bacteria developing inhibitory activities (Rampogu et al., 2018.). Thus, according to Valera et al. (2016), due to the properties presented, ginger is promising, regarding the possibility of being used to prevent infections caused by this bacterium.

With respect to the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*, often associated with pneumonia, the presence of ginger shogaols inhibits it (Gull et al., 2012; Ghazemzadeh et al., 2018). However, according to Lee et al., (2018) the presence of shogaol is almost zero in fresh plants and about 4% of 6-gingerol (by weight). With this perspective, the substances 6-gingerol and 8-gingerol show performance in *P. aeruginosa* for acting on the phenotypes of the second messengers and *quorum sensing*, considered the main bacterial virulence mechanism responsible for interbacterial communication (Lee et al., 2018). Kumar et al., (2013), following the same view, it was found that the zingerone present in the Ginger root reduces the mobile aspects of *P.aeruginosa* (Pili type IV), inhibiting bacterial fixation on surfaces and delaying biofilms.

It regard to *Staphylococcus aureus*, bacteria that cause systemic pathology such as Bacterial Endocarditis and *Staphylococcus epidermidis*; Grégio et al. (2006) and Gull et al. (2012), respectively, demonstrated good performance of ginger in these microorganisms. Polyphenolic ketones, alkylated gingerols, ethanol extract (in the form of n-hexane) showed antibacterial activity (altering cellular c-di-GMP and consequently reducing biofilm) (Park et al., 2008; Kim et al., 2017). Such activity occurs, for example, against gram-negative, responsible for periodontal diseases, such as *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* (Park et al., 2008).

In essential oil, from Ginger there is its interaction with the active site of the enzyme 6-hydromethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase (SAHPPK) from *Staphylococcus aureus* developing inhibitory activities (Rampogu et al., 2018). Whereas, in *Staphylococcus epidermidis* there is interaction between the monoterpenoid glycoside,  $\alpha$ -1,8-cineol-3,6-dihydroxy-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside combined with trans-3-hydroxy-1,8-cineol 3- Ginger's O- $\beta$ -D-glucopyranoside, thus preventing such bacteria (Guo et al., 2017).



On the other hand, Avcioglu et al. (2016), Gull et al. (2012); Karuppiiah & Rajaram (2012) observed that the essential oil of *Zingiber officinale* (such as ethanolic) reduces biofilms formed by the genus *Klebsiella* (*Klebsiella ornithinolytica*, *Klebsiella oxytca* and *Klebsiella terrigena*) varying in terms of the concentration used.

Currently, compounds with potential antibiofilm are used, such as chlorhexidine, although it is known that it can cause side effects such as dental staining and loss of taste. As a result, Ginger in the form of crude extract and methanolic fraction presents itself as a natural option for the control of *Streptococcus mutans* in dental biofilm and even in tooth decay (Grégio et al., 2006; Hasan et al., 2015; Jain et al., 2015). Both compounds (crude extraction or methanolic fraction) interfere with hydrophobicity, between dental surface-bacterial interactions, through flavonoids, which reduce the enzyme GTFase and AG I / II, during synthesis / adherence, mainly of insoluble and dependent Glucans sucrose. Furthermore, the sites of bacterial binding, pH and integrity of exopolysaccharides are disturbed, in the formation of the climax community, disrupting pathogenicity and the sensing quorum (functioning as an anticariogenic), in addition to the expression of bacterial genes (Hasan et al., 2015; Miari et al., 2020).

On the other hand, *in vitro* studies that initially used 2% Chlorhexidine to eliminate *Enterococcus faecalis* (Valera et al., 2016), this gel by itself, failed to eliminate the bacteria and the performance of Ginger (glycolic extract), proved to be essential to reduce it, (although there was no complete elimination) having its action enhanced, when used with Calcium Hydroxide. Similar to the findings, Jami & Araujo (2017) used 15% hydroalcoholic extract from *Zingiber officinale*, managing to inhibit the strain, in the same proportion as using 5.25% sodium hypochlorite, and more studies using this extract are promising. Karuppiiah & Rajaram. (2012) reached one of the smallest zones of growth inhibition with *Enterobacterium*, using the ethanolic extract of Ginger rhizomes.

In strains of *Bacillus spp.* there was good antimicrobial activity (Karuppiiah et al., 2012), due to the presence of shogaols in ginger enzymes (Ghasemzadeh et al., 2018), having according to Gull et al. (2012) better effects through the methanolic extract. With regard to *Salmonella typhi*, Gull et al. (2012) achieved good activities with ethanolic extract, while with *Shigella* both ethanolic and methanolic extract showed low (and same) results.

As for the antifungal action in species of *Candida spp.* the essential oil of ginger shows activity, due to its main active component zingiberene (Pozzati et al., 2008), in addition to diterpenes and galanolactone (Park, 2008). In addition, hydroalcoholic extract, such as ethanolic (Aghazadeh et al., 2016; Grégio et al. 2012; ValeraA et al., 2016.), through 6-gingerol, 8-gingerol and 6-shogaol these are able to inhibit, effectively *Candida albicans* in sessile format, but 10-gingerol, 8-shogaol and 10-shogaol at 100µg / ml had no effect on it. (Lee et al., 2018). Therefore, it was noticed that Ginger has antifungal mechanisms that act in an improved way, when compared to Fluconazole (Pozzati et al., 2015), Nystatin and Amphotericin B (Aghazadeh et al., 2016). The mechanism of action consists of altering

the development of hyphae in colonies (does not act on planktonic forms), repressing the expression of genes (ECE1 and HWP), without causing toxic responses, in the analyzed concentrations (Lee et al., 2018).

When the crude extract of its rhizome is analyzed, it contains antimycobacterial effects (such as 10-gingerol), inhibiting *Mycobacterium species* (responsible for tuberculosis), strains of the respiratory tract and even fungal species (Park et al., 2008).

All authors agree, as for Ginger to present a vast potential for solutions, such as dental products that aim at the disruption of pathogenic dental biofilm and, consequently, fight microbial infections (mainly, in precarious places where there is rapid development of pathogens), through excellent activities *in vitro* provided by plant compounds. *Zingiber officinale*, in the form of hydroalcoholic fractions or crude extract, contains therapeutic properties and is shown to be antifungal and antibiofilm, as it causes changes in virulence factors (such as the quorum sensing, for example) and thus reduces their pathogenicity (Kumar et al., 2013; Hasan et al., 2015; Avcioglu et al., 2016; Valera et al., 2016; Miari et al., 2020). However, *in vitro* studies are still insufficient for the development of compounds, since new studies need to be developed *in situ* and *in vivo* to prove the reported non-genotoxicity and to analyze the possible drug interactions, in order to also standardize the methodology collection of extracts (Grégio et al., 2006; Park et al., 2008; Gull et al., 2012; Karuppiyah et al., 2012; Kumar et al., 2013; Hasan et al., 2015; Jain et al., 2015; Avcioglu et al., 2016; Pozzati et al., 2015; Aghazadeh et al., 2016; Ghasemzadeh et al., 2018; Lee et al., 2018; Rampogu et al., 2018; Miari et al., 2020 ).

## 5 | FINAL CONSIDERATIONS

It is concluded that, currently, there is a search for more natural substances that contain antibacterial, antifungal properties and mainly, antibiofilms. The herbaceous *Zingiber officinale* has several active compounds that act on several microorganisms such as *Bacillus sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*, which are responsible for infectious diseases (such as Bacterial Endocarditis), being their action still very related to the properties of the compound used.

Although it is known, superficially, about the properties of Ginger, its study and use in whole some media such as Odontology, are still predominantly *in vitro*. Future research needs to be developed *in situ* and *in vivo*, to analyze toxicity, drug interactions, side effects of the plant and standardization of the extraction collection methodology, so that, in the future, ginger can be used in toothpaste, rinses and ointments for medical and dental purposes.

## REFERENCES

AGHAZADEH, M. *et al.* Survey of the Antibiofilm and Antimicrobial Effects of *Zingiber officinale* (in Vitro Study). **Jundishapur Journal of Microbiology**. v.9, n.2, p.1-4, 2016.

AVCIOGLU, N.H., SAHAL, G., BILKAY, I.S. Antibiofilm effects of *Citrus limonum* and *Zingiber officinale* oils on biofilm formation of *Klebsiella ornithinolytica*, *Klebsiella oxytoca* and *Klebsiella terrigena* species. **African Journal of Traditional Complementary Alternative Medicines**, v.13, n.6, p.61-67, 2016.

CAVALCANTE, R. As plantas na Odontologia:Um guia prático. São Paulo, 3ª ed 2016.

GHASEMZADEH, A., *et al.* Formation of 6-, 8- and 10-Shogaol in Ginger through Application of Different Drying Methods: Altered Antioxidant and Antimicrobial Activity. **Molecules**, v.23, n.7, p.1-12, 2018.

GREGIO, A.M.T. *et al.* Ação antimicrobiana do *Zingiber officinale* frente à microbiota bucal. **Estudos de Biologia**, v.28, n.62, p.61-66, 2006.

GULL, I *et al.* Inhibitory effect of *Allium sativum* and *Zingiber officinale* extracts on clinically important drug resistance pathogenic bacteria. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.11, n.8, p.10-16,2012.

GUO, T., *et al.* Two new monoterpenoid glycosides from the fresh rhizome of Tongling White Ginger (*Zingiber officinale*). **Natural Product Research**, v.32, n.1, p.71-76, 2017.

HASAN, S., DANISHUDDIN, M., KHAN, A.U. Inhibitory effect of *Zingiber officinale* towards *Streptococcus mutans* virulence and caries development: *in vitro* and *in vivo* studies. **BMC Microbiology**. v.15, n.1, p.1-14, 2015.

JAIN, I., *et al.* Use of Traditional Indian Plants in the inhibition of Caries- Causing Bacteria- *Streptococcus mutans*-. **Brazilian Dental Journal**, v.6, n.2,p.110 115, 2015

JAMI, S.G., ARAUJO, P.D.H. Efecto antimicrobiano del extracto, aceite de jengibre (*zingiber officinale*) sobre cepas de enterococcus faecalis: Estudio in vitro. **ODONTOLOGÍA**, v.19, n.1, p.89-97,2017

KARUPPIAH, P., RAJARAM, S. Antibacterial effect of *Allium sativum* cloves and *Zingiber officinale* rhizomes against multiple-drug resistant clinical pathogens. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.2, n.8, p.597-601, 2012.

KIM, H.S., PARK, H.D. Ginger Extract Inhibits Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. **PLOS ONE**, v.8, n.9, p.1-16,2013

KUMAR, L., CHHIBBER, S., HARJAI, K. Zingerone inhibit biofilm formation and improve antibiofilm efficacy of 2 ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Fitoterapia**, v.90, p.73-78,2013.

LEE, J.H., *et al.* Antibiofilm and Antivirulence Activities of 6-Gingerol and 6-Shogaol Against *Candida albicans* Due to Hyphal Inhibition. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.8, n.299, p.1-10, 2018.

MARSH & MARTIN. Microbiologia Oral. 6ª ed. Elsevier Health Science, 2018.

MIARI *et al.* Natural products and polysorbates: Potential Inhibitors of biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **The Journal of Infection Developing Countries** v.14, n.6, p.580-588, 2020.

PARK, M., JUNGDON, B.A.E, DAE-SIL L.E.E. Antibacterial Activity of [10]-Gingerol and [12]-Gingerol isolated from Ginger Rhizome Against Periodontal Bacteria. **Phytotherapy Research**.v.22, n.11, p.1446-1449,2008.

PEREIRA AS. *et al.* Metodologia da pesquisa científica. [e-book]. Santa Maria. Ed. UAB/NTE/UFSM, 2018.

POZZATI, P. *et al.* *In vitro* activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible **Candida spp.** **Canadian Journal of Microbiology**, v.54, n.11, p.950- 956, 2008.

RAMPOGU, S. *et al.* Ginger (*Zingiber officinale*) phytochemicals gingerenone -A and shogaol inhibit SaHPPK: molecular docking, molecular dynamics simulations and *in vitro* approaches. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.7, n.1, p.1-15, 2018.

VALERA, MC. *et al.* Action of Chlorhexidine, *Zingiber officinale* on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, and Endotoxin in the Root canals. **The Journal of Contemporary Dental Practice**. v.17, n.2, p.114-118,2016.

# CAPÍTULO 3

## ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DAS FOLHAS DE *GARCINIA GARDNERIANA* (BACUPARI) COLETADAS EM MINAS GERAIS

Data de aceite: 04/02/2021

Data de submissão: 08/12/2020

### Ueveton Pimentel da Silva

Universidade Federal de Viçosa,  
Viçosa-MG, Brasil,  
<http://lattes.cnpq.br/6994698110420645>;

### Bianca Lana de Sousa

Universidade Federal de Viçosa,  
Viçosa-MG, Brasil,  
<https://orcid.org/0000-0002-7801-490X>;

### Eduardo Vinícius Vieira Varejão

Universidade Federal de Viçosa,  
Viçosa-MG, Brasil,  
<https://orcid.org/0000-0002-1830-725X>;

### Gabriela Milane Furlani

Universidade Federal de Viçosa,  
Viçosa-MG, Brasil,  
<http://lattes.cnpq.br/3911500941572096>;

### Marcelo Henrique dos Santos

Universidade Federal de Viçosa,  
Viçosa-MG, Brasil,  
<https://orcid.org/0000-0003-1440-4340>.

**RESUMO:** *Garcinia gardneriana* (Planch. & Triana) Zappi, popularmente conhecida como bacupari, é uma árvore nativa da região Amazônica, dispersa por todo o território brasileiro e usada na medicina popular brasileira para o tratamento de infecções e alívio da dor. Essas propriedades terapêuticas e, portanto, o uso tradicional dessa planta tem sido corroborados

por diversos estudos em que se comprovaram atividades anti-inflamatória, analgésica, anticâncer, antimicrobiana e antioxidante de extratos da planta. Entretanto, segundo nossos levantamentos bibliográficos, nenhum estudo sobre atividade antioxidante de extratos de espécimes de *G. gardneriana* coletadas na região sudeste do Brasil foi conduzido até o momento. No presente trabalho, folhas de *G. gardneriana* coletadas no Estado de Minas Gerais foram submetidas a extração em aparelho de Soxhlet utilizando hexano, acetato de etila (AcOEt) e etanol (EtOH) como solventes. Os extratos resultantes foram analisados quanto ao conteúdo de fenólicos totais pelo método de Folin–Ciocalteu e tiveram suas atividades antioxidantes avaliadas por ensaio de captura de radicais livres utilizando DPPH•. Os extratos em AcOEt e EtOH foram obtidos em rendimentos de 4,9 e 10,1% (m/m), respectivamente, e apresentaram atividades antioxidantes superiores ao controle positivo em todas as concentrações avaliadas. Na menor concentração testada (31,25 µg mL<sup>-1</sup>), o extrato em EtOH reduziu em 70% a atividade do DPPH•. O ensaio de Folin–Ciocalteu indicou que o extrato em etanol apresenta cerca de 30% de fenólicos a mais do que o extrato em acetato de etila. Em conclusão, os resultados do presente estudo permitem sugerir que compostos fenólicos estão envolvidos na atividade antioxidante de extratos de *G. gardneriana*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Compostos fenólicos; 1,1-difenil-2-picril-hidrazila; Folin–Ciocalteu.

## ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *GARCINIA GARDNERIANA* (BACUPARI) LEAF EXTRACTS COLLECTED IN MINAS GERAIS

**ABSTRACT:** *Garcinia gardneriana* (Planch. & Triana) Zappi, popularly known as bacupari, is a tree native to the Amazon region, dispersed throughout the Brazilian territory and used in Brazilian folk medicine to treat infections and relieve pain. These therapeutic properties and, therefore, the traditional use of this plant has been corroborated by several studies in which anti-inflammatory, analgesic, anticancer, antimicrobial and antioxidant activities of plant extracts have been proven. However, to the best of our knowledge, no study on the antioxidant activity of extracts from specimens of *G. gardneriana* collected in the southeastern region of Brazil has been conducted so far. In the present work, *G. gardneriana* leaves collected in the Minas Gerais state were submitted to extraction in a Soxhlet apparatus using hexane, ethyl acetate (AcOEt) and ethanol (EtOH) as solvents. The resulting extracts were analysed for the content of total phenolics by the Folin–Ciocalteu method and had their antioxidant activities evaluated by free radical capture assay using DPPH\*. The AcOEt and EtOH extracts were obtained in 4.9 and 10.1% (m/m) yields, respectively, and showed antioxidant activities greater than the positive control in all evaluated concentrations. At the lowest concentration tested (31,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), the EtOH extract reduced DPPH\* activity by 70%. The Folin–Ciocalteu assay indicated that the ethanol extract has about 30% more phenolics than the ethyl acetate extract. In conclusion, the data suggest that phenolic compounds are involved in the antioxidant activity of extracts from *G. gardneriana*. Additional studies will be carried out to isolate and identify phenolic compounds in plant extracts.

**KEYWORDS:** Phenolic Compounds; 1,1-difenil-2-picril-hidrazil; Folin–Ciocalteu.

### 1 | INTRODUÇÃO

*Garcinia gardneriana* (Planch. & Triana) Zappi (*Rheedia gardneriana* Planch. & Triana (1860)), conhecida popularmente como bacupari, é uma árvore nativa da região Amazônica e disseminada por grande parte do território brasileiro (OTUKI *et al.*, 2011; PEREIRA, 2017). Esta espécie apresenta importância econômica, em função do uso de sua madeira em carpintaria, ecológica, pelo fato de seus frutos consistirem em importante fonte de alimento para diversas espécies animais e diferentes biomas brasileiros (PEREIRA, 2017) e, ainda, pelo seu uso na medicina tradicional brasileira para o tratamento de gastrite, hepatite e outras inflamações (OTUKI *et al.*, 2011; TRIBESS *et al.*, 2015; YAZBEK *et al.*, 2019). This article investigated the effect of *G. gardneriana* extracts from leaves, bark and seeds and two isolated compounds in ear oedema and leucocytes migration caused by croton oil. The topical application of the extract of *G. gardneriana* leaves was able to reduce (70±3%, and ID50 0.33mg/ear. De fato, estudos têm demonstrado várias propriedades terapêuticas associadas a diferentes partes de *G. gardneriana*, incluindo atividades anti-inflamatória, analgésica, anticâncer, antimicrobiana e antioxidante (VERDI *et al.*, 2004; OTUKI *et al.*, 2011; DEMENCIANO *et al.*, 2020).

As propriedades antioxidantes do bacupari foram reportadas recentemente

por FERNANDEZ *et al.* (2018) e DEMENCIANO *et al.* (2020). O grupo de pesquisa de FERNANDEZ (2018) avaliou o conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante de uma gama de extratos de plantas nativas da Amazônia, incluindo *G. gardneriana*. Naquele trabalho, extratos metanólicos das cascas, polpas e sementes apresentaram efeito antioxidante. Em trabalho complementar, DEMENCIANO *et al.* (2020) demonstraram atividade antioxidante de extratos em etanol das folhas e frutos de *G. gardneriana* coletada no Mato Grosso do Sul. Estes autores atribuíram o efeito observado ao conjunto de compostos fenólicos identificados nos extratos botânicos, principalmente flavonóides, biflavonóides e xantonas.

O perfil de metabólitos secundários e, conseqüentemente, as propriedades bioativas de plantas, em geral, podem ser influenciados pela região de cultivo devido a inúmeros efeitos, tais como sazonalidade, clima e solo, entre outros (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Desta forma, plantas de diferentes regiões devem ser incorporadas a estudos direcionados ao desenvolvimento de agentes bioativos, incluindo antioxidantes. Apesar de alguns trabalhos já terem avaliado as atividades antioxidantes de extratos de diferentes partes de espécimes de *G. gardneriana* coletadas em algumas regiões do Brasil, segundo nossas pesquisas bibliográficas, não há relato sobre a avaliação destas propriedades em espécimes da planta coletados na região Sudeste do Brasil.

Os antioxidantes naturais conferem proteção ao organismo dos danos celulares resultantes do excesso de radicais livres. Tal proteção é atribuída à diminuição do estresse oxidativo, induzido pelos radicais livres (DIAS *et al.*, 2020). O estresse oxidativo, por sua vez, é associado a diferentes patologias que acometem o ser humano, incluindo câncer, doença de Alzheimer, hipertensão, diabetes e envelhecimento celular precoce, entre outros (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; POPRAC *et al.*, 2017). Além da importância voltada para a saúde humana, os antioxidantes também são úteis na indústria alimentícia, atuando na conservação de alimentos, principalmente na redução da oxidação lipídica (DEL RÉ; JORGE, 2012). Deste modo, a descoberta de novos agentes antioxidantes é um fator de fundamental importância nos setores alimentício, farmacêutico e medicinal.

## 2 | METODOLOGIA

### 2.1 Coleta, Preparo da Planta e Obtenção dos Extratos

As folhas de *G. gardneriana* foram coletadas na cidade de Viçosa, Minas Gerais, Brasil (20°47'48.6" S 42°51'35.6" W) em fevereiro de 2017. A exsicata (VIC 2604) foi depositada no herbário da Universidade Federal de Viçosa. Após a colheita, as amostras foram secas em temperatura ambiente, trituradas em liquidificador industrial e submetidas a extração em aparelho Soxhlet. A extração foi conduzida usando os solventes hexano, acetato de etila e etanol, sucessivamente (2 x 1,4 L), por duas horas cada.

## 2.2 Atividade Antioxidante

Os extratos das folhas da *G. gardneriana* foram submetidos a avaliação da atividade antioxidante por meio de teste de captura de radicais livres, de acordo com a metodologia reportada por RUFINO *et al.* (2007). O teste foi realizado em placa de microdiluição contendo 96 poços (TPP, Trasadingen Switzerland) usando o reagente 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH<sup>•</sup>). Os extratos foram preparados em etanol absoluto nas concentrações de 2; 1; 0,5; 0,25 e 0,125 mg mL<sup>-1</sup>. Uma alíquota de 25 µL das soluções foi transferida para cada poço na placa de microtubos e, em seguida, foram adicionados 175 µL de DPPH<sup>•</sup> 0,1 mmol L<sup>-1</sup> (etanol absoluto). As placas foram mantidas em repouso ao abrigo de luz durante uma hora e então submetidas a análise por espectrofotometria no Ultravioleta-Visível (UV-Vis) a 517 nm (Thermo Scientific, Vantaa, Finland). As porcentagens de atividade antioxidante (AA%) foram calculadas de acordo com a equação 1, descrita por MILANI *et al.* (2012), considerando a absorbância (Ab) do DPPH<sup>•</sup> como controle negativo. Di-*terc*-butil metilfenol (BHT), preparado nas mesmas condições e concentrações dos extratos, foi utilizado como controle positivo. As soluções de extratos em ausência de DPPH<sup>•</sup> foram utilizadas como branco. As concentrações finais dos extratos em cada poço variaram entre 31,25 e 500 µg mL<sup>-1</sup>. O experimento foi realizado em triplicata, com duas réplicas biológicas cada.

$$\text{Equação 1: } AA(\%) = 100 - \{[(Ab \text{ amostra} - Ab \text{ branco}) \times 100] / Ab \text{ controle negativo}\}$$

## 2.3 Análise Estatística

Análise de variância (ANOVA) e o pós-teste de Tukey (p < 0,05) foram utilizados para comparar as atividade antioxidante dos diferentes extratos usando GraphPad Prism<sup>®</sup> 5.0 software.

## 2.4 Conteúdo de Fenólicos Totais

O conteúdo de fenólicos totais dos extratos foi determinado pelo método de Folin–Ciocalteu, de acordo com a metodologia reportada por BABA E MALIK (2015), com modificações. Os extratos brutos foram preparados na concentração de 2 mg mL<sup>-1</sup> em etanol absoluto. Uma alíquota de 100 µL das soluções foram diluídas em água destilada até um volume final de 3 mL. As novas soluções dos extratos, à 67 µg mL<sup>-1</sup> em etanol 3,33% (v/v) foram utilizadas para o teste. Um volume de 150 µL das soluções diluídas foi transferido para placa de microdiluição de 96 poços, seguida da adição de 25 µL do reagente de Folin–Ciocalteu (Dinâmica Química Contemporânea LTDA<sup>®</sup>, São Paulo, Brazil). Decorridos três minutos, foram adicionados 100 µL de solução de carbonato de sódio (20% m/v) a cada micropoço. A placa foi mantida em repouso durante 60 minutos e as leituras de absorbância (650 nm) foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis (Thermo Scientific,



Vantaa, Finland). A curva de calibração foi construída usando solução de ácido gálico em concentrações finais variando de 0 a 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O conteúdo de fenólicos totais foi expresso em  $\text{mg g}^{-1}$  equivalente de ácido gálico (EAG) através da curva padrão  $y = 32,591x - 2,2749$ ;  $R_2 = 0,9987$ , na qual  $y$  é a absorbância e  $x$  é concentração de ácido gálico.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

As folhas de bacupari foram submetidas a extração por Soxhlet, utilizando solventes de diferentes polaridades, adicionados sucessivamente. O primeiro solvente utilizado foi o hexano, objetivando extrair compostos de baixa polaridade. Posteriormente, a extração foi conduzida em acetato de etila para a obtenção de componentes de polaridade intermediária. Etanol foi adicionado após o AcOEt visando à extração de metabólitos de maior polaridade. As massas e os rendimentos, calculados em relação à matéria seca, estão dispostos na Tabela 1.

Extratos	Massa (g)	Rendimento (%)
Hexano	3,02	3,0
Acetato de etila	4,86	4,9
Etanol	10,10	10,1

Tabela 1- Massas e rendimentos dos extratos obtidos de folhas de *Garcinia gardneriana*.

Na maioria dos trabalhos já reportados na literatura sobre obtenção e avaliação biológica de extratos brutos das folhas bacupari, os extratos foram obtidos por maceração, utilizando principalmente água e etanol como solventes (VERDI *et al.*, 2004; OTUKI *et al.*, 2011; DEMENCIANO *et al.*, 2020). No presente estudo, foi utilizada a extração por Soxhlet, uma vez que se trata de um processo exaustivo e, normalmente, proporciona maiores rendimentos em relação aos procedimentos realizados a frio e demanda menor tempo de extração (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

#### 3.1 Atividade Antioxidante

Os extratos obtidos foram submetidos a avaliação da atividade antioxidante em concentrações finais entre 31,25 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 1). O extrato em hexano apresentou baixa atividade antioxidante, enquanto os demais extratos exerceram atividade antioxidante superior ao controle positivo BHT em todas as concentrações testadas. O extrato em etanol foi o que apresentou maior atividade antioxidante, alcançando 70% de atividade à 31,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , menor concentração avaliada.

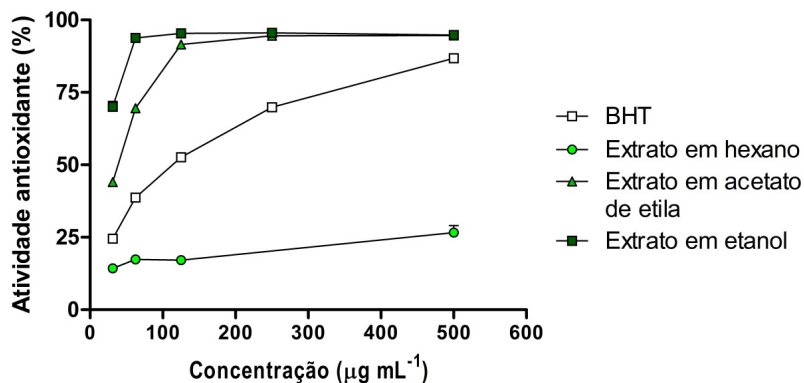


Figura 1 - Atividade antioxidante de extratos das folhas de *Garcinia gardneriana*.

Com o objetivo de enfatizar o efeito da concentração na atividade antioxidante, comparação da capacidade antioxidante entre os extratos e o controle positivo foi realizada na concentração de  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 2). Nessa concentração, os efeitos antioxidantes dos extratos em acetato de etila e etanol foram superiores ao BHT ( $P < 0,05$ ).

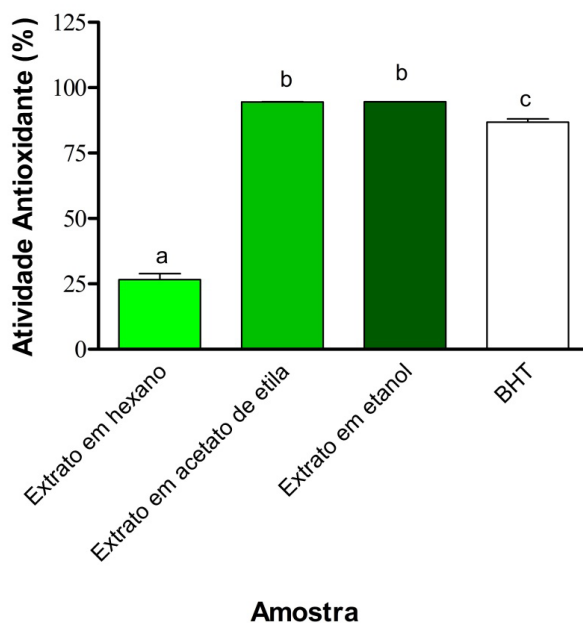


Figura 2 - Atividade antioxidante (média  $\pm$  desvio padrão) de extratos de folhas de *Garcinia gardneriana* a  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Letras iguais indicam ausência de diferença estatística ( $p < 0.05$  de acordo com ANOVA seguido de pós-teste de Tukey).

Os resultados da atividade antioxidante constatados para os extratos das folhas de bacupari coletadas em Minas Gerais corroboraram com os efeitos reportados por DEMENCIANO *et al.* (2020). Naquele trabalho, foi constatada a atividade antioxidante do extrato bruto das folhas de bacupari em etanol, com valor  $IC_{50}$  (metade da concentração inibitória máxima) de  $16,95 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Tais autores ainda reportaram frações em hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidrometanol (oriundas do extrato etanoico), apresentando  $IC_{50}$  entre  $14,27$  e  $35,46 \mu\text{g mL}^{-1}$ . DEMENCIANO *et al.* (2020) também identificaram diferentes compostos fenólicos, principalmente flavonoides, biflavonoides e xantonas como constituintes químicos do extrato etanoico. Os autores atribuíram o efeito antioxidante aos metabólitos identificados, cujas atividades antioxidantes já foram reportadas na literatura.

### 3.2 Conteúdo de fenólicos totais

A fim de relacionar a atividade antioxidante dos extratos à presença de compostos fenólicos, o conteúdo de fenólicos totais foi determinado através do teste de Folin–Ciocalteu (BABA; MALIK, 2015). O teor total de fenólicos foi determinado para os extratos em acetato de etila e etanol, amostras que apresentaram atividade antioxidante. Ambos os extratos apresentaram elevadas taxas de EAG/g (Tabela 2). Como esperado, o extrato das folhas em etanol demonstrou o maior conteúdo de fenólicos, resultando em aumento de cerca de 30% em relação à outra amostra, em total acordo com os resultados de atividade antioxidante.

	Extratos	
	Acetato de etila	Etanol
Conteúdo de fenólicos (EAG $\text{g}^{-1}$ )*	$220,4 \pm 5,8$	$286,4 \pm 0,3$

\* equivalente de ácido gálico por grama de amostra.

Tabela 2 - Conteúdo de fenólicos totais (média  $\pm$  desvio padrão) de extratos de folhas de *G. gardneriana* em acetate de etila e etanol.

## 4 | CONCLUSÃO

No presente trabalho foi constatado o elevado potencial antioxidante de extratos botânicos das folhas de *G. gardneriana* coletadas em Minas Gerais. Em concentração superiores à  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  os extratos em acetato de etila e etanol apresentaram atividades antioxidantes aproximadamente iguais aos valores observados para os controles positivos. Elevados valores de fenólicos totais foram encontrados para os extratos ativos, o que permite relacionar a atividade antioxidante desses extratos à presença destes metabólitos secundários. Trabalhos futuros para isolamento e caracterização das estruturas químicas desses compostos trarão à luz maior conhecimento sobre os compostos químicos responsáveis pelas atividades medicinais de *G. gardneriana*, podendo servir de base para o desenvolvimento de extratos padronizados para uso fitoterápico ou mesmo para a

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) pelo apoio financeiro ao desenvolvimento do projeto.

## REFERÊNCIAS

- BABA, Shoib A.; MALIK, Shahid A. **Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii* Blume.** Journal of Taibah University for Science, v. 9, n. 4, p. 449–454, 2015. DOI: 10.1016/j.jtusci.2014.11.001.
- DEL RÉ, P.V.; JORGE, N. **Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde.** Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 14, n. 2, p. 389–399, 2012. DOI: 10.1590/S1516-05722012000200021.
- DEMENCIANO, S.; SILVA, M.; ALEXANDRINO, C.; KATO JUNIOR, W. H.; FIGUEIREDO, P. O.; GARCEZ, W. S.; CAMPOS, R. P.; GUIMARÃES, R.; SARMENTO, U. C.; BOGO, D. **Antiproliferative Activity and Antioxidant Potential of Extracts of *Garcinia gardneriana*.** Molecules, v. 25, n. 14, p. 3201, 2020. DOI: 10.3390/molecules25143201.
- DIAS, M. C. F.; SOUSA, B. L.; IONTA, M.; TEIXEIRA, R. R.; GOULART, T. Q.; FERREIRA-SILVA, G. A.; PILAU, E. J.; SANTOS, M. H. **Synthesis of 1,2,3-triazole benzophenone derivatives and evaluation of *in vitro* sun protection, antioxidant properties, and antiproliferative activity on HT-144 melanoma cells.** Journal of the Brazilian Chemical Society, 2020, *in press*. DOI: 10.21577/0103-5053.20200211.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.** Revista da Associação Médica Brasileira, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997. DOI: 10.1590/S0104-42301997000100014.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. **Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários.** Química Nova, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007. DOI: 10.1590/S0100-40422007000200026.
- GraphPad Prism®, versão 5.0; GraphPad Software, San Diego, CA, EUA, 2007.
- MILANI, L. I. G.; TERRA, N. N.; FRIES, L. L. M.; CICHOSKI, A. J.; REZER, A. P. S.; BACKES, A. M.; PARODIA, C. G. **Atividade antioxidante e antimicrobiana in vitro de extratos de caqui (*Diospyros kaki* L.) cultivar Rama Forte.** Brazilian Journal of Food Technology, v. 15, n. 2, p. 118–124, 24, 2012. DOI: 10.1590/S1981-67232012005000003.
- FERNANDEZ, I. M.; CHAGAS, E. A.; FILHO, A. A. M.; MALDONADO, S. A. S.; SANTOS, R. C.; CHAGAS, P. C.; DUARTE, E. D. R. **Evaluation of total phenolic compounds and antioxidant activity in amazon fruit.** Chemical Engineering Transactions, v. 64, p. 649–654, 2018. DOI: 10.3303/CET1864109.

OLIVEIRA, V. B.; ZUCHETTO, M.; OLIVEIRA, C. F.; PAULA, C. S.; DUARTE, A. F. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por CLAE-DAD de *Dicksonia sellowiana* (presl.).** Hook, dicksoniaceae. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 18, n. 1 suppl 1, p. 230–239, 2016. DOI: 10.1590/1983-084X/15\_106.

OTUKI, M. F.; BERNARDI, C. A.; PRUDENTE, A. S.; LASKOSKI, K.; GOMIG, F.; HORINOUCI, C. D.; GUIMARÃES, C. L.; FERREIRA, J.; DELLE-MONACHE, F.; CECHINEL-FILHO, V.; CABRINI, D. ***A. Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi. (Clusiaceae) as a topical anti-inflammatory alternative for cutaneous inflammation.** Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, v. 109, n. 1, p. 56–62, 2011. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2011.00689.x.

PEREIRA, B. A. S. ***Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi. Árvores do Bioma do Cerrado**, p. 1–5, 2017. Disponível em: <http://www.arvoresdobiomacerrado.com.br/site/2017/04/03/garcinia-gardneriana-planch-triana-zappi/>. Acesso em 30 nov. 2020.

POPRAČ, P.; JOMOVA, K.; SIMUNKOVA, M.; KOLLAR, V.; RHODES, C. J.; VALKO, M. **Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases.** Trends in Pharmacological Sciences, v. 38, n. 7, p. 592, 2017. DOI: 10.1016/j.tips.2017.04.005

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH.** Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), p. 1–4, 2007.

TRIBESS, B.; PINTARELLI, G. M.; BINI, L. A.; CAMARGO, A.; FUNEZ, L. A.; DE GASPER, A. L.; ZENI, A. L. B. **Ethnobotanical study of plants used for therapeutic purposes in the Atlantic Forest region, Southern Brazil.** Journal of Ethnopharmacology, v. 164, p. 136–146, 2015. DOI: 10.1016/j.jep.2015.02.005.

VERDI, L. G.; PIZZOLATTI, M. G.; MONTANHER, A. B.; BRIGHENTE, I. M.; SMÂNIA JÚNIOR, A.; SMÂNIA ED EDE, F.; SIMIONATTO, E. L.; MONACHE, F. D. **Antibacterial and brine shrimp lethality tests of biflavonoids and derivatives of *Rheedia gardneriana*.** Fitoterapia, v. 75, n. 3–4, p. 360–363, 2004. DOI: 10.1016/j.fitote.2003.12.023.

YAZBEK, P. B.; MATTA, P.; PASSERO, L. F.; SANTOS, G. D.; BRAGA, S.; ASSUNÇÃO, L.; SAUINI, T.; CASSAS, F.; GARCIA, R. J. F.; HONDA, S. **Plants utilized as medicines by residents of Quilombo da Fazenda, Núcleo Picinguaba, Ubatuba, São Paulo, Brazil: A participatory survey.** Journal of Ethnopharmacology, v. 244, n. July, p. 112123, 2019. DOI: 10.1016/j.jep.2019.112123.

# CAPÍTULO 4

## CARACTERÍSTICAS ESPECTROFLUORIMÉTRICAS DO SORO DE DUAS ESPÉCIES DE PEIXES NEOTROPICAIS E A INTERAÇÃO COM METILPARATHION

Data de aceite: 04/02/2021

**Dilson Silva**

Universidade do Estado do Rio de Janeiro,  
Departamento de Matemática Aplicada,  
Rio de Janeiro - RJ

**Frederico Freire Bastos**

Universidade do Estado do Rio de Janeiro,  
Departamento de Bioquímica e Toxicologia, Rio  
de Janeiro - RJ

**Madelayne Cortez Moreira**

Universidade do Estado do Rio de Janeiro,  
Departamento de Matemática Aplicada,  
Rio de Janeiro - RJ

**Celia Martins Cortez**

Universidade do Estado do Rio de Janeiro,  
Departamento de Matemática Aplicada,  
Rio de Janeiro - RJ

Este trabalho teve o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro, FAPERJ.

**RESUMO:** Neste trabalho comparamos as características espectrofluorimétricas dos soros de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg 1887) e pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*, Spix & Agassiz, 1829), duas espécies peixes naturais da bacia do rio São Francisco, e discutimos aspectos da sua interação com o metilparathion, um organofosforado usado em agricultura e piscicultura em muitos países. Os resultados

mostram que a concentração de proteína total no soro de pacu é maior do que no soro do pintado, mas a fração albumina neste último soro (10% da proteína total) foi aproximadamente 1,7 vezes maior do que no primeiro (5,9% da proteína total). A albumina do pintado pode conter maior número de resíduos de triptofanos do que a do pacu, mas a supressão da fluorescência do soro deste peixe pelo metilparathion foi mais intensa do que a observada no soro do pintado, a 20 °C e 30 °C. Como já foi demonstrado para o pacu, o metilparathion parece ligar-se à albumina do pintado formando complexo.

**PALAVRAS - CHAVE:** soro de peixe, espectrofluorescência, metilparathion, pintado, pacu.

### SPECTROFLUORIMETRIC CHARACTERISTICS OF SERA FROM TWO NEOTROPICAL FISH SPECIES AND THEIR INTERACTIONS WITH METHYL PARATHION

**ABSTRACT:** In this work, we compare spectrofluorimetric characteristics of the sera from pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg 1887) and catfish pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*, Spix & Agassiz, 1829), two fish species of the São Francisco River basin, and discuss aspects of their interaction with methyl parathion. This organophosphate is used in agriculture and fish farming aquaculture in many countries. The results show that the total protein concentration in the pacu serum is higher than in the pintado serum, but the albumin fraction in pintado serum (10% of the total protein) was

approximately 1.7 times higher than in the first one (5, 9% of the total protein). Pintado albumin seems to contain a greater number of tryptophan residues than that pacu, but the fluorescence quenching of pacu serum by methyl parathion was more intense than that observed in pintado serum, at 20 °C and 30 °C. As has already been shown for pacu, methyl parathion appears to bind to pintado albumin forming complex.

**KEYWORDS:** fish serum, spectrofluorescence, methyl paration, pintado, pacu.

## 1 | INTRODUÇÃO

Na literatura há muitos dados sobre a composição, estrutura e as características fluorimétricas das albuminas séricas humana (HSA) e bovina (BSA), mas são raras as referências sobre albuminas séricas de peixes (Kragh-Hansen, 1990; Silva *et al.*, 2004a,b,c; Özyiğit *et al.*, 2015; Cheng *et al.*, 2019).

A albumina, a maior proteína aniônica dos vertebrados, representa 50 a 60% do total das proteínas plasmáticas e participa na maioria das ligações de substâncias no soro, em conjunto com as  $\alpha$ 1-ácido-glicoproteínas ( $\alpha$ -AGP), além do seu importante papel na distribuição hídrica entre os compartimentos intersticiais, intracelulares e o plasma. A ligação de substâncias tóxicas exógenas ou xenobióticos às proteínas do plasma tem grande importância toxicológica, pois influencia na distribuição e eliminação dessas substâncias, e regula a intensidade e a duração dos seus efeitos no organismo. (Kragh-Hansen 1981, 1990)

A competição de xenobióticos com substâncias endógenas por sítios de ligação em uma proteína plasmática pode afetar fortemente a biodisponibilidade de ambas, com consequências fisiológicas potencialmente muito sérias. Sabe-se que a albumina transporta ligantes endógenos e xenobióticos em sítios específicos, formando ou não complexos. Assim, a albumina funciona como reguladora da fração livre dessas substâncias, que é, em geral, a fração biologicamente ativa. (Peters, 1996; Bertucci e Domenici, 2002; Silva *et al.*, 2004; 2010; Goss *et al.*, 2018; Nehru *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2020).

Os peixes têm sido apontados como um bom *modelo de bioindicador da ação de poluentes*, devido as suas características de disponibilidade, reprodução e ciclo de vida, entre outras, sendo considerados também uma fonte de produtos clínicos e nutricionais a base de albumina [Bolis *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2010; Januar *et al.*, 2015].

Acreditamos que o monitoramento da ligação de xenobióticos a albuminas de peixes, através de métodos biofísicos de análise, possa funcionar como um meio eficaz de utilização dessa interação como um modelo bioindicador. A precisão e a rapidez são fatores relevantes para a seleção da espectroscopia como um desses métodos, tendo como ponto de partida o estudo das propriedades físico-químicas e espectroscópicas/espectrofluorimetria específicas do soro e das proteínas séricas.

Neste trabalho, comparamos os resultados de dados espectrofluorimétricos do soro de dois peixes neotropicais: o pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg 1887) e o pintado

(*Pseudoplatystoma corruscans*, Spix & Agassiz, 1829), ambos nativos da bacia do rio São Francisco, discutindo alguns aspectos da interação do metilparation (MP) com os soros. O MP é um pesticida da classe organofosforado usado em agricultura e piscicultura no Brasil e em muitos outros países.

## 2 | OS PEIXES: PACU E PINTADO

O pacu (Figura 1a) é uma espécie de peixe típica e abundante na região centro-oeste brasileira, é nativa da Bacia Paraná-Paraguai - incluindo os rios Mogi-Guaçu, Pardo, Grande, Tietê e Paranapanema - que abrange áreas de grande atividade agrícola. Isto confere a essa espécie de peixe significativa relevância dos pontos de vista ecotoxicológico, econômico e comercial. A classificação taxonômica completa do pacu é: *Actinopterygii* / *Characiformes* / *Characidae* / *Serrasalminae* / *Piaractus mesopotamicus*.

O surubim-pintado (Figura 1b) é um bagre conhecido por várias denominações vulgares, como bagre-rajado, surubi, surubi-de-cama, surubim, sorubim-caparari, piracajara, piracajara, brutelo, caparari, caçonete, “spotted sorubim”, ou simplesmente pintado. Possui cabeça grande e achatada e o corpo de coloração parda com manchas negras, formado por placas ósseas; é um dos maiores peixes fluviais brasileiros, chegando até 3,5 m de comprimento. Sua importância econômica tem se destacado de forma crescente, especialmente devido à boa adaptação da espécie aos sistemas semi-intensivos e intensivos de produção em viveiros, aliada à grande aceitação do sabor de sua carne.



Figura 1 – (a) Exemplar de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) e (b) exemplar de pintado (*Corruscans pseudoplatystoma*, Spix e Agassiz, 1829).

Há dois pontos críticos a serem considerados quanto à preservação e melhora no crescimento dessas espécies de peixe, são eles: (1) a malha hidrográfica, onde a espécie vive nativamente, se estende por áreas de intensa atividade agrícola, onde resíduos de



pesticidas determinam um impacto negativo para os peixes; e (2) o uso de pesticidas nos tanques de criação para o controle de predadores [Silva *et al.*, 2010a].

O desenvolvimento de artrópodes predadores, que se alimentam de pós-larvas de peixes em tanques de aquicultura, é favorecido pelo clima nas áreas tropicais e subtropicais. Assim, os artrópodes prejudicam a produção de peixes de espécies nativas comerciáveis e o uso de pesticidas tem grande repercussão econômica. Porém, os pesticidas também afetam os peixes. Em tanques tratados com organofosforados, por exemplo, o crescimento e ganho de peso de muitos animais é lento, que também são mais susceptíveis a doenças.

As características e a quantidade das proteínas séricas, especialmente da albumina, são dados necessários para o estabelecimento de padrões que venham a orientar na escolha do pesticida e da dosagem para uso em piscicultura, além do conhecimento dos efeitos tóxicos deste nas espécies sob cultivo [Cunha Bastos *et al.*, 1998, Cunha Bastos *et al.*, 1999]. Entretanto, a deficiência desses dados torna árduo o trabalho para o estabelecimento de padrões, mesmo dentro da mesma família, pela variação da concentração da albumina com variáveis nutricionais, fisiológicas e geográficas [Maillou e Nimmo, 1993a; 1993b; Andreeva, 2010; 2011]. Além disso, a concentração total e a relativa de cada fração de proteína são ainda afetadas por doenças (infecções, processos inflamatórios e estressores ambientais) [Ellsaesser; Clem, 1987; Grasman *et al.*, 2000]. Os peixes também podem exibir poliploidia, responsável por muitas das variações observadas nas proteínas plasmáticas [Komatsu *et al.*, 1970; Allendorf *et al.*, 2015].

### 3 | O METILPARATION

O MP tem sido usado no controle de pragas na agricultura e em ambientes de produção de peixes de cativeiro em escala comercial; mas, como todo organofosforado, é tóxico e potencialmente letal à vida aquática e terrestre [Cunha Bastos *et al.*, 1999]. Este tipo de pesticida inibe a *acetilcolinesterase*, enzima sináptica presente em várias áreas do sistema nervoso, especialmente no sistema nervoso parassimpático. As alterações causadas por essa inibição é a maior manifestação do envenenamento por esses pesticidas, que podem levar à morte [Sultatos *et al.*, 1985; Cunha Bastos 1998, 1999]. Há muitos relatos de Neurotoxicidades e neuropatologias tardias em humanos causadas por organofosforados [Hsieh, 2001].

Quando expostos a xenobióticos, os organismos desenvolvem mecanismos de defesa que incluem uma grande variedade de reações e processos metabólicos envolvendo a absorção, distribuição, biotransformação e excreção. Duas propriedades do pesticida devem ser consideradas no seu uso, a sua *persistência* (tempo de atividade) e *meia-vida* (intervalo de tempo para a atividade cair 50%). O MP caracteriza-se por ter baixa persistência, quando comparado com outros agentes, mas sua disseminação nas águas gera consequências graves na saúde de peixes, de diversos organismos aquáticos e

demais elementos da cadeia alimentar. [Howard, 1989, Salazar *et al.*, 1997, Almeida, 2006]

## 4 | ESPECTROSCOPIA DE FLUORÊSCENCIA

A *espectrofluorimetria* ou *espectroscopia de fluorescência* consiste em um conjunto de técnicas de levantamento de dados sob a forma de *espectros de emissão de fluorescência*, que permite a análise físico-química de substâncias e interações moleculares. Este potencial é, primariamente, resultado do tempo de vida dos estados excitados, definido como o *intervalo médio de tempo que a substância fluorescente, o fluoróforo, permanece em estado excitado*.

Ao absorver luz, o fluoróforo é excitado e atinge um dos seus mais altos níveis de energia vibracional, um *estado eletrônico singleto* ( $S_1$ ). Em seguida, a molécula relaxa rapidamente (tempo  $< 10^{-13}$  s) e passa por níveis intermediários de energia, até cair no *nível mais baixo do estado singleto* ( $S_1$ ). Esse processo chama-se *conversão interna*, e não emite radiação. A emissão de fluorescência se dá pelo retorno ao *estado fundamental* ( $S_0$ ), e depende da diferença energética entre  $S_1$  e  $S_0$ . Se essa diferença for suficiente, o equilíbrio térmico é atingido com a emissão de fluorescência. Assim, a *fluorimetria se baseia na detecção de fótons emitidos pelo fluoróforo retornando ao estado fundamental* [Lakowicz, 2006].

A fluorescência natural de uma proteína se deve à presença de um ou mais resíduos de aminoácido fluorescente na sua estrutura primária. Dos 20 que podem compor as proteínas, apenas três aminoácidos possuem essa propriedade: *triptofano* (TRP), *fenilalanina* e *tirosina*, pois os seus anéis aromáticos contêm nuvens de elétrons  $\pi$  deslocados, que favorecem a interação com outros sistemas  $\pi$  e a transferência de elétrons. A fenilalanina e o TRP são muito hidrofóbicos, e a tirosina, devido à hidroxila ligada ao anel aromático, é mais hidrófila. O TRP, quando ligado à cadeia protéica, é o aminoácido de maior rendimento quântico (relação entre a quantidade de energia emitida e a absorvida). A tirosina livre em solução emite forte fluorescência, mas sua emissão é fraca nas proteínas. Nestas, a emissão da fenilalanina é virtualmente desprezível. Em geral, a desnaturação de proteínas resulta em aumento da emissão da tirosina. Quando excitadas com luz de comprimento de onda ( $\lambda$ ) igual a 280 nm ( $\lambda=280$  nm), a fluorescência das proteínas se deve especialmente à tirosina. A faixa de excitação seletiva do TRP é  $290 < \lambda < 305$  nm. [Souza *et al.*, 2000; Lakowicz, 2006].

A interação de ligantes com proteínas tem sido estudada por meio da análise espectroscópica da *supressão da fluorescência* (*fluorescence quenching*), ou *diminuição da intensidade da fluorescência emitida por uma substância* [Silva *et al.*, 2004; 2010]. Esta supressão pode resultar de uma variedade de processos, como reações de estados excitados, transferência de energia, formação de complexo e supressão por colisão ou dinâmica. A *supressão dinâmica* é o resultado da proximidade entre o *supressor* (*quencher*)

e o fluoróforo, enquanto a *supressão estática* resulta da formação de complexo na ligação do ligante com o fluoróforo (ligante-fluoróforo). [Lakowicz, 2006]

## 5 | MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo de pesquisa para os experimentos aqui apresentados foi aprovado pelo Comitê de Bioética da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, e está em conformidade com as diretrizes nacionais para a proteção de seres humanos e bem-estar animal.

Foram utilizados nesse trabalho quinze exemplares de pacu (média de comprimento  $25 \pm 3$  cm e de peso  $300 \pm 15$  g) e onze de pintado (média de comprimento  $72 \pm 8$  cm e de peso  $703 \pm 48$  g), todos geneticamente controlados, machos, juvenis e saudáveis. Seis exemplares de pacu foram obtidos no Centro Nacional de Pesquisa de Peixes Tropicais (CEPTA), em Cachoeira de Emas no Município de Pirassununga, SP; e nove exemplares, na estação de pesca localizada em Mococa, SP. Os exemplares de pintado foram obtidos de estação de pesca de São João da Boa Vista, SP. Os peixes foram mantidos em tanques de 1000 litros, à temperatura em torno de  $28^\circ\text{C}$  (aeração e filtração adequadas), e alimentados com ração balanceada. Todos os experimentos foram realizados após um período mínimo de 10 dias de adaptação dos animais ao novo ambiente.

**Preparação da amostra.** Amostra de 5 ml de sangue de cada peixe vivo era coletada por punção da aorta abdominal, sendo o animal devolvido ao tanque após a coleta. Foram usadas seringas hipodérmicas descartáveis com agulhas de calibre 22, sendo o sangue passado para tubos B-D Vacutainers<sup>®</sup> (Becton-Dickinson, Bethesda, MD) e deixado por 20 min à temperatura ambiente para coagulação. Em seguida, o sangue era resfriado por 30 min em geladeira para retração do coágulo e centrifugado a 3.000 rpm (centrífuga Fanem, modelo Flex 3400) para separação do soro. A cromatografia por afinidade [Travis e Pannell 1973] foi utilizada para determinar a fração de albumina no soro. Utilizamos uma coluna *HiTrap Blue*, equilibrada com o tampão fosfato de potássio (50 mM com pH 7,4) com fluxo de  $2 \mu\text{L}/\text{min}$  e leitura espectrofotométrica em 280 nm.

**Fluorimetria.** As medidas de fluorescência foram feitas em um equipamento Hitachi-F3010, usando 3 ml solução de soro (em tampão fosfato pH 7,4), contendo cerca de  $2 \mu\text{M}$  albumina, nas temperaturas de  $20^\circ$  e  $30^\circ\text{C}$  (dentro da escala considerada natural para essas espécies de peixes). O comprimento de onda de excitação ( $\lambda_{\text{Exc}}$ ) foi 290 nm, a emissão de fluorescência foi registrada de 300 a 450 nm e as fendas de emissão e excitação foram de 3 nm.

Para o estudo da interação do MP com o soro por medidas de supressão da fluorescência, em 3 ml de solução estoque de soro foram adicionadas alíquotas de 2 ml de MP, fazendo a concentração na cubeta variar, ao todo, de 2 a 24 mM de MP (volume total adicionado desprezível). Os espectros de fluorescência foram registrados após 2 min, tempo de repouso necessário para estabilizar a solução.

O MP usado foi purificado a partir da preparação comercial da Bayer, Folidol P600,

por cromatografia de camada fina (placas de sílica gel 60 F254, 20 x 20 cm, com zona de concentração) usando diclorometano como fase móvel. Para prevenir degradação, a solução de MP foi estocada em ambiente escuro a -10 °C.

A existência de filtros primário e secundário foi avaliada por medidas de absorbância nos comprimentos de onda de emissão e excitação com um espectrofotômetro Shimadzu UV-160A. O efeito filtro primário foi corrigido pela equação de Parker (Puchalski *et al.*, 1991) e o secundário foi desprezível.

## 6 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração de proteína total medida através do método de Peterson (1977) no soro do pacu foi de 34,0 mg/ml e no de pintado foi 16,0 mg/ml. A fração de albumina avaliada em coluna *HiTrap Blue* (método de verde de bromocresol) foi 2,0 mg/ml, para o pacu, e 1,6 mg/ml, para o pintado. Assim, a fração albumina representou 5,9% da proteína total do soro de pacu e 10,0% do soro do pintado.

No passado, a baixa concentração proteica deixou dúvidas sobre a presença de albumina no soro de peixes. Mas, Byrnes e Gannon (1992) sequenciaram o cDNA da albumina do *Salmo salar*, e mostraram sua homologia com as albuminas de outros vertebrados [Metcalf *et al.*, 1998]. Tem sido observado que a concentração de albumina no soro de peixe é dependente da espécie e, em geral, tende a ser bem mais baixa do que em soro de mamíferos, que é de 30 a 40 mg/ml [Andreeva, 2011]. Januar *et al.* [2015] descobriram uma variação de 3,49 a 12,61 mg/ml na concentração da albumina em extratos aquosos de tecido muscular de 17 espécies de perciformes comuns no mercado de pescado da Indonésia.

A Figura 2 apresenta os espectros de fluorescência ( $\lambda_{Exc}=290nm$ ) obtidos para os soros de pintado e pacu diluídos em tampão fosfato, pH 7,4, nas temperaturas de 30 °C (Figura 2a) e 20 °C (Figura 2b). Embora não haja na literatura corrente qualquer informação sobre o número e a localização dos resíduos de TRP em albuminas de peixes tropicais, a emissão de fluorescência pelo soro excitado com luz UV de 290 nm atestou a presença deste aminoácido.

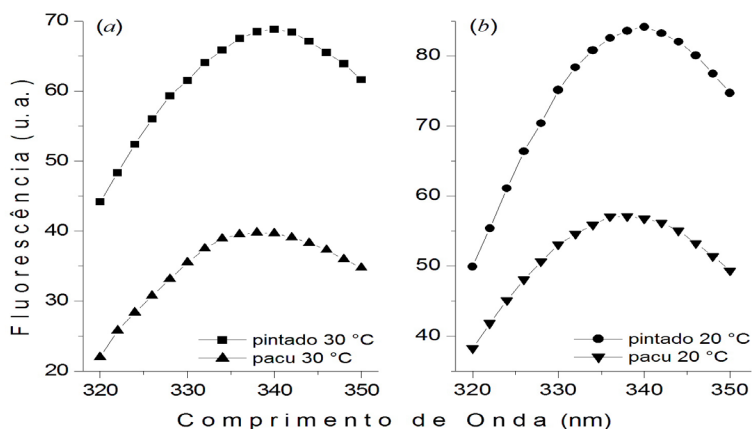


Figura 2 – Espectros de fluorescência emitida pelos soros de pintado (11 exemplares, média de comprimento  $72 \pm 8$  cm e de peso  $703 \pm 48$  g) e pacu (15 exemplares, média de comprimento  $25 \pm 3$  cm e de peso  $300 \pm 15$  g) em unidade arbitrária (u.a.), nas temperaturas de (a) 20 °C e (b) 30 °C  $\lambda_{exc} = 290$  nm, tampão fosfato 10 mM, pH 7,4).

As Figuras 2a e 2b destacam a intensidade significativa de fluorescência emitida pelo soro do pintado, que deve estar fortemente relacionada com a emissão da fração albumina, independente da presença de outras proteínas. Como pode-se observar, o soro de pintado emite quase o dobro da fluorescência emitida pelo soro do pacu. As concentrações de albumina estimadas pelo método de verde de bromocresol orientou a diluição dos soros. Essa superioridade da fluorescência do soro do pintado pode ser devida a um número maior de resíduos de TRP.

A Figura 3 mostra os gráficos normalizados de supressão da fluorescência (razão  $F/F_0$  versus concentração de MP) para os soros de pintado (Figura 3a) e pacu (Figura 3b) em presença do pesticida, para 30 °C e 20 °C. Cada ponto dos gráficos corresponde à média aritmética dos cinco valores de máxima emissão de fluorescência ( $\lambda_{m\acute{a}x} = 337$  nm, para o pacu e  $\lambda_{m\acute{a}x} = 339$  nm, para o pintado), tendo sido os valores de desvio padrão menores que 0,1%. Os experimentos foram realizados em triplicata e os gráficos retratam a média aritmética dos resultados, com desvio padrão menor que 1%.

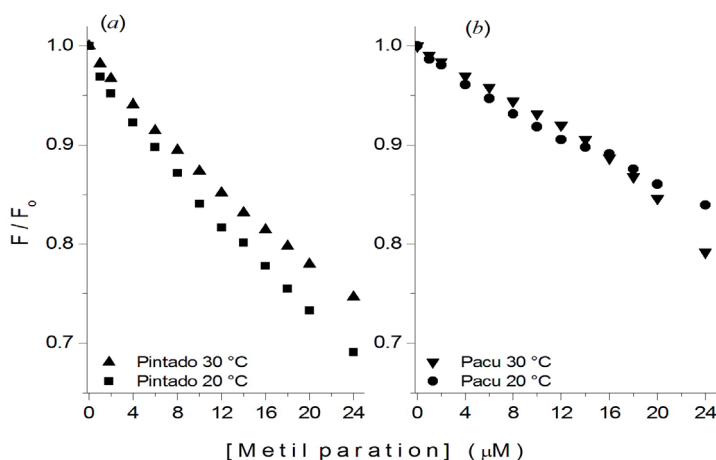


Figura 3 – Curvas de supressão normalizada dos soros de pintado (11 exemplares, média de comprimento  $72 \pm 8$  cm e de peso  $703 \pm 48$  g) e pacu (15 exemplares, média de comprimento  $25 \pm 3$  cm e de peso  $300 \pm 15$  g), pelo MP para (a) 20 °C e (b) 30 °C ( $\lambda_{exc} = 290$  nm, tampão fosfato 10 mM, pH 7,4).

Para a razão molar de 1:1 (MP/albumina), verificou-se que a supressão do soro do pacu (Figura 3a) foi de cerca de 1,90 ( $\pm 0,05$ )%, para 20 °C, e 1,70 ( $\pm 0,04$ )%, para 30 °C; atingindo a taxa de 10% quando as razões molares eram aproximadamente 7:1 nas duas temperaturas. Para a razão molar de 1:1 MP/albumina, o pesticida suprimiu cerca de 4,80( $\pm 0,02$ )% e 3,30( $\pm 0,01$ )% da fluorescência do soro do pintado (Figura 3b) a 20 °C e 30 °C, respectivamente. Ou seja, o aumento da temperatura reduziu essa taxa nos dois casos. A supressão chegou a 10% para as concentrações de MP em torno de 3 (20 °C) e 4 vezes (30 °C) mais altas do que a de albumina.

A supressão da fluorescência do soro pelo MP indica que suas moléculas conseguem acessar o(s) subdomínio(s) onde se encontra(m) o(s) os resíduo(s) de TRP nas proteínas. Em um trabalho prévio (Silva *et al.*, 2004c), o confronto do gráfico de supressão da HSA (com um único resíduo de TRP no subdomínio IIA) com o da BSA (com dois resíduos de TRP, um em IIA e outro no subdomínio IB) permitiu sugerir que o sítio de ligação para o pesticida estaria mais próximo do subdomínio IIA do que do IB. O subdomínio IIA é um dos principais locais de ligação da HSA para substâncias hidrofóbicas, como é o caso do MP. Nesta região há sítios de ligação estáveis e de alta afinidade para a maioria dos xenobióticos [Peters *et al.*, 1996], em especial para drogas em concentrações terapêuticas (Bertucci *et al.*, 2002), mas, em concentrações mais altas, outros sítios de menores seletividade e afinidade também são ocupados.

A similaridade entre os gráficos de supressão da fluorescência pelo MP da albumina pura e do soro do pacu, observada em um estudo anterior [Silva *et al.*, 2010a], nos levou

a propor que esta proteína seria responsável por toda a supressão ocorrida no soro, especialmente para concentrações de MP abaixo de 10 mM; mas, a concentrações maiores, outras proteínas séricas também poderiam contribuir. Outra observação feita naquele estudo foi que o MP se liga à albumina sérica de pacu e forma um complexo, com base na variação do nível de supressão com a temperatura. Pela comparando de resultados específicos, sugeriu-se que a molécula da albumina do pacu poderia conter dois resíduos de TRP; e que esta teria menor afinidade com o MP, quando comparada com a HSA e BSA.

O fato da taxa de supressão da fluorescência do soro do pintado cair com o aumento da temperatura, como mostra a Figura 3a, pode estar indicando que o MP se liga à albumina desta espécie de peixe também por formação de complexo [Silva *et al.*, 2010a; 2010b]. A queda da taxa de supressão da fluorescência com a elevação da temperatura advém da redução da excitabilidade dos resíduos de TRP pela complexação da proteína com o ligante [Lakowicz, 2006].

É importante ainda observar na Figura 3 que, que o aumento da concentração do pesticida causa um encurvamento para baixo nos gráficos de supressão da fluorescência dos soros das duas espécies de peixe; mudança esta mais pronunciada no soro do pacu. Isto sugere a ocorrência de supressão combinada (estática e dinâmica, simultaneamente). No caso do soro do pacu, este fenômeno surgiu para concentrações de MP acima de 12 mM [Silva *et al.*, 2010a].

Com base na emissão de fluorescência mais intensa e na taxa mais elevada de supressão desta no soro do pintado, em relação ao do pacu (Figura 2), pode-se levantar três hipóteses: (1) a afinidade do MP com as proteínas séricas do pintado seria maior do que com as do pacu; (2) o número de sítios para o MP seria maior, ou estes seriam mais expostos para ligação, nas proteínas séricas do pintado; ou (3) os sítios para o MP no soro do pintado estariam mais próximos do(s) resíduo(s) de TRP do que no soro do pacu.

## 7 | CONCLUSÃO

De acordo com os resultados pode-se concluir que a concentração de proteína total do soro de pacu é mais elevada do que do pintado, mas a fração albumina no soro deste último peixe (10% da proteína total) é aproximadamente 1,7 vezes maior do que no soro do primeiro (5,9% da proteína total).

Através da espectrofluorimetria foi possível observar que, para soluções de soro contendo a mesma concentração de albumina, a fluorescência emitida pelo soro do pintado foi mais intensa do que a emitida pelo do pacu, indicando que a albumina do pintado possa ter maior número de resíduos de TRP na sua estrutura. A supressão da fluorescência nos dois soros foi observada logo para pequenas concentrações do MP, tendo sido mais intensa no soro do pintado do que no do pacu. Além disso, a supressão foi mais intensa para temperaturas mais baixas, sugerindo que o MP possa ligar-se à albumina sérica do

pintado e formar um complexo, como anteriormente demonstrado para o pacu.

Nas temperaturas de 20 °C e 30 °C, a fluorescência do soro do pintado foi suprimida em 10%, quando a concentração do MP era em torno de três e quatro vezes, respectivamente, mais alta do que a da albumina. Para o pacu, esse nível de supressão só foi atingido em concentração de MP cerca de sete vezes maior do que a da albumina.

Os resultados aqui apresentados são particularmente interessantes para estudos ecotoxicológicos e de avaliação de risco ambiental, principalmente pela deficiência atual de trabalhos que abordem características de soros de peixes e da afinidade destes com poluentes ambientais.

## REFERÊNCIAS

- ALLENDORF, F.W.; BASSHAM, S.; CRESKO, W.A.; LIMBORG, M.T.; SEEB, L.W.; SEEB, J.E. Effects of crossovers between homeologs on inheritance and population genomics in polyploid-derived salmonid fishes. *Journal of Heredity*, v.106, n.3, p.217-227, 2015.
- ALMEIDA, L.C.; AGUIAR, L.H.; MORAES, G. Effect of methyl parathion on the muscle and brain acetylcholinesterase activity of matrinxã (*Brycon cephalus*). *Ciência Rural*, v.35, n.6, p.1412-1416, 2005.
- ANDREEVA, A. M. Mechanisms of the Plurality of *Scorpaena porcus* L. Serum Albumin. *Open Journal of Marine Science*, v.1, p. 31-35, 2011.
- ANDREEVA, A. M. Structure of fish serum albumins. *Journal Evolutionary Biochemistry and Physiology*, v. 46, p.135-144, 2010.
- BERTUCCI, C.; DOMENICI, E. Reversible and covalent binding of drugs to human serum albumin... *Current Medicinal Chemistry*, v.9, p.1463-1481, 2002.
- BHATTACHARYYA, M.; CHAUDHURI, U.; PODDAR, R.K. Evidence for cooperative binding of chlorpromazine with haemoglobin... *Biochemical and Biophysical Research Communication*, v.167, p.1146-1153, 1990
- BOLIS, C.L.; PICCOLELLA, M.; DALLA VALLE, A.Z.; RANKIN, J.C. Fish as model in pharmacological and biological research. *Pharmacological Research*, v.44, p.265-280, 2001.
- BYRNES, L.; GANNON, F. Sequence analysis of a second cDNA encoding Atlantic salmon (*Salmo salar*) serum albumin. *Gene*, v.120, p.319-320, 1992.
- CHENG, D.; MORSCH, M.; SHAMI, G.J.; CHUNG, R.S.; BRAET, F. Albumin uptake and distribution in the zebrafish liver... *Experimental Cell Research*, vol. 374, p.162-171, 2019.
- CUNHA BASTOS, V.L.F.; SILVA FILHO, M.V.; ROSSINI, A.; CUNHA BASTOS, J. The Activation of Parathion by Brain and Liver of a Brazilian Suckermouth Benthic Fish. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v.64, p.149-156, 1999.



CUNHA BASTOS, V.L.F.; ROSSINI, A.; RIBEIRO PINTO, L.F.; DE LIMA, L.M.; CECCARELLI, P.S.; COELHO, M.G.P.; CUNHA BASTOS, J. Different Sensitivities to Paraoxon of Brain and Serum Cholinesterases from Pacu. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*, v. 60, p.1-8, 1998.

DE LA VEGA-SALAZAR, M.Y.; MARTÍNEZ TABCHE, L.; MACÍAS GARCIA, C.; DÍAZ PARDO, E. Methyl Parathion Impact on Water Sediment and Benthic Macroinvertebrates from the Ignacio Ramirez Dam in Mexico. *Toxicological and Environmental Chemistry*, v.71, p.81-93, 1999.

ELLSAESSER, C.; CLEM, L.W. Blood serum chemistry measurements of normal and acutely stressed channel catfish. *Comparative Biochemistry Physiology*, v.88A, p.589-594, 1987.

GRASMAN, K.A.; ARMSTRONG, M.; HAMMERSLEY, D.L.; SCANLON, P.F.; FOX, G.A. Geographic variation in blood plasma protein concentrations of young herring gulls... *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 125, p.365-375, 2000.

GOSS, K.U.; BITTERMANN, K.; HENNEBERGER, L.; LINDEN, L. Equilibrium biopartitioning of organic anions - A case study for humans and fish. *Chemosphere*, vol. 199, p.174-181, 2018.

JANUAR HI, FAJARNINGSIH ND, ZILDA DS, BRAMANDITO A, WRIGHT AD. Concentration of fish serum albumin (FSA) in the aqueous extract of Indonesian Perciformes fishes' muscle tissue. *Nature Product Research*, v.22, p.1-3, 2015.

KOMATSU, S.K.; MILLER, H.T.; DEVRIES, A.L.; OSUGA, D.T. ; FEENEY, R.E. Blood plasma proteins of cold-adapted Antarctic fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.32, p.519-527, 1970.

KRAGH-HANSEN, U. Molecular Aspects of Ligand Binding to Serum Albumin. *Pharmacological Reviews*, v.33, p.17-53, 1981.

KRAGH-HANSEN, U. Structure and ligand binding properties of human serum albumin. *Danish Medical Bulletin*, v.37, p.57-84. 1990.

KUAN-YUNG HSIEH, BAO-QUEY HUANG, RONG-LAYZ WU; CHUN-TE CHEN. Color effects of lures on the hooking rates of mackerel longline fishing. *Fisheries Science* v.67, p.408-414, 2001.

LAKOWICZ, J.R. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd Edition. Kluwer Academic, Plenum Publishers, New York, 2006.

MAILLOU, J.; NIMMO, L.A. Albumin-like proteins in the serum of rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology, part B*, v.104, 387-393, 1993a.

MAILLOU, J.; NIMMO, I.A. Identification and some properties of an albumin-like protein in the serum of prespawning Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comparative Biochemistry and Physiology, part B*, v.104, p.401-405, 1993b.

METCALF, V. J.; GEMMELL, N. J. Fatty Acid Transport in Cartilaginous Fish... *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 31, n.1, p.55-64, 2005.

NEHRU, S.; VEERALAKSHMI, S.; KALAISELVAM, S.; SUBIN DAVID, S.P.; SANDHYA, J.; ARUNACHALAM, S. Protein binding and antioxidant studies of diimine... complexes. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 1-12, 2020

ÖZYİĞİT, I.E.; AKTEN, E.D.; PEKCAN, Ö. Structural analysis of peptide fragments following the hydrolysis of bovine serum albumin by trypsin and chymotrypsin. *Journal of Biomolecular Structure Dynamics*, v.6, p.1-9, 2015.

PETERS, Jr. T. All about albumin, biochemistry, genetics, and medical applications. Academic Press, New York, 1996.

PETERSON, G.L. Simplification of protein assay method of Lowry et. al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, v.83, p.346-356, 1977.

SALLES C.; SOUZA R.H.S.; SALLES J.B.; CUNHA BASTOS V.L.F.; DIAS, R.A.; CUNHA BASTOS J. Biochemical characteristics of liver and brain monoamine oxidase from pacu. *Journal of Fish Biology*, v.58, p.1301-1310, 2001.

SILVA, D., CORTEZ-MOREIRA, M., BASTOS, V.L.F.C., CORTEZ, C.M. The Interaction of Methyl-parathion with Serum and Albumin of the Neotropical Fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.73, p.32-37, 2010a

SILVA, D., CORTEZ-MOREIRA, M., BASTOS, V.L.F.C., CORTEZ, C.M. Spectrofluorimetric study of the Interaction of methyl-parathion with fish serum albumin. *Fish Physiology and Biochemistry*, v.36, p. 427-433, 2010b.

SILVA, D.; CORTEZ, C.M.; LOURO S.R.W. Chlorpromazine interactions to sera albumins. A study by the quenching of fluorescence. *Spectrochimica Acta, Part A*, v.60, n.5, p.1215-1223, 2004a.

SILVA, D.; CORTEZ, C.M.; LOURO S.R.W. Quenching of the intrinsic fluorescence of albumin by chlorpromazine and hemin. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.37, p.963-968. 2004b.

SILVA, D.; CORTEZ, C.M.; BASTOS J.C.; LOURO S.R.W. Methyl parathion interaction with human and bovine serum albumin. *Toxicological Letters*, v.147, p.53-61, 2004c.

SOUZA, E.S.; HIRATA, I.Y.; JULIANO, L.; ITO, A.S. End-to-end distance distribution in bradykinin observed by Forster resonance energy transfer. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1474, p.251-261, 2000.

SULTATOS, L.G.; MINOR, L.D.; MURPHY, S.D. 1985. Metabolic activation of phosphorotioate pesticides. *Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics* 232: 624-630, 1985.

SUN, Shan, YUAN Zhe; LU, Yuanqi. Characterization Of Interaction Between Buddleoside And Bovine Serum Albumin. *Química Nova* Vol.43 No.7, 2020.

# CAPÍTULO 5

## ENZIMAS DIGESTIVAS E DISTÚRBIOS FISIOPATOLÓGICOS ASSOCIADOS

Data de aceite: 04/02/2021

Data da submissão: 28/12/2020

### Julianna Oliveira de Lucas Xavier

Universidade Federal de Juiz de Fora,  
Rua José Lourenço Kelmer, s/n, Campus  
Universitário, Juiz de Fora, MG, Brazil  
<http://lattes.cnpq.br/9651862658018674>

### Ana Lúcia Santos de Matos Araújo

Universidade Federal de Juiz de Fora,  
Rua José Lourenço Kelmer, s/n, Campus  
Universitário, Juiz de Fora, MG, Brazil  
<http://lattes.cnpq.br/0893671644627346>

### Orlando Vieira de Sousa

Universidade Federal de Juiz de Fora,  
Rua José Lourenço Kelmer, s/n, Campus  
Universitário, Juiz de Fora, MG, , Brazil  
<http://lattes.cnpq.br/9797237863119033>

**RESUMO:** A digestão dos alimentos compreende transformações físicas e químicas no trato gastrointestinal para que os nutrientes possam ser absorvidos. Essas transformações são desencadeadas por reações enzimáticas que catalisam a quebra de carboidratos, gorduras e proteínas. O amido, por exemplo, é degradado pela  $\alpha$ -amilase salivar (ptialina) e  $\alpha$ -amilase pancreática que hidrolisam ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 internas, enquanto a  $\alpha$ -glicosidase hidrolisa polissacarídeos, oligossacarídeos e dissacarídeos em glicose e outros monossacarídeos nas posições  $\alpha$ -1,6 e  $\alpha$ -1,4 das extremidades. As lipases gástrica e pancreática

catalisam a digestão dos lipídios da dieta, como os triacilgliceróis, gerando diacilgliceróis, monoacilglicerol e ácidos graxos. Além disso, doenças do metabolismo, como o diabetes mellitus tipo 2, dislipidemias, aterosclerose, infarto agudo do miocárdio, doença isquêmica do coração e acidente vascular encefálico, assim como a obesidade, o que pode resultar na síndrome metabólica, direta ou indiretamente estão relacionadas às enzimas digestivas. Entre os fármacos usados no tratamento dessas enfermidades, destacam-se os inibidores da  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glicosidase e lipase pancreática. Nesse contexto, os aspectos relevantes sobre as enzimas digestivas foram abordados neste capítulo com o intuito de oferecer um conteúdo consistente e atualizado para os estudantes e profissionais de ciências biológicas e da saúde.

**PALAVRAS - CHAVE:** Enzimas digestivas. Síndrome metabólica. Diabetes. Dislipidemia. Obesidade.

### DIGESTIVE ENZYMES AND ASSOCIATED PATHOPHYSIOLOGICAL DISORDERS

**ABSTRACT:** The digestion of food comprises physical and chemical changes in the gastrointestinal tract so that nutrients can be absorbed. These transformations are triggered by enzymatic reactions that catalyze the breakdown of carbohydrates, fats and proteins. Starch, for example, is degraded by salivary  $\alpha$ -amylase (ptialin) and pancreatic  $\alpha$ -amylase that hydrolyze internal  $\alpha$ -1,4 glycosidic bonds, while  $\alpha$ -glycosidase hydrolyzes polysaccharides, oligosaccharides and disaccharides in glucose and other monosaccharides at the positions  $\alpha$ -1,6

and  $\alpha$ -1,4 of the extremities. Gastric and pancreatic lipases catalyze the digestion of dietary lipids, such as triacylglycerols, generating diacylglycerols, monoacylglycerol and fatty acids. In addition, metabolic disorders such as type 2 diabetes mellitus, dyslipidemia, atherosclerosis, acute myocardial infarction, ischemic heart disease and stroke, as well as obesity, which can result in metabolic syndrome, directly or indirectly are related to digestive enzymes. Among the drugs used in the treatment of these diseases,  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glycosidase and pancreatic lipase inhibitors have been highlighted. In this context, the relevant aspects of digestive enzymes were addressed in this chapter in order to offer consistent and updated content for biological and health sciences students and professionals.

**KEYWORDS:** Digestive enzymes. Metabolic syndrome. Diabetes. Dyslipidemia. Obesity.

## 1 | INTRODUÇÃO

O processo digestivo consiste de um conjunto de transformações físicas e químicas em que os alimentos sofrem no trato gastrointestinal (TGI) após sua ingestão. Para serem absorvidos, os nutrientes são produzidos a partir de reações enzimáticas que catalisam a quebra de carboidratos, gorduras e proteínas, transformando em moléculas mais simples para serem assimiladas pelas células, onde irão exercer importantes funções. Entre as enzimas responsáveis pela digestão dos alimentos no TGI,  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glicosidase e lipases (gástrica e pancreática) são destacadas (GOODMAN, 2010; HARTENSTEIN; MARTINEZ, 2019; JANIÁK, 2016).

Durante a digestão, o amido, por exemplo, é degradado pela ação da  $\alpha$ -amilase salivar (ptialina), que o hidrolisa a oligômeros, enquanto a  $\alpha$ -amilase pancreática produz maltose, maltotriose e oligossacarídeos (dextrinas), ocorrendo ruptura nas ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 internas. Sendo mais potente, a  $\alpha$ -glicosidase, enzima ligada à borda da membrana intestinal, hidrolisa polissacarídeos, oligossacarídeos e dissacarídeos em glicose e outros monossacarídeos nas posições  $\alpha$ -1,6 e  $\alpha$ -1,4 das extremidades (GOODMAN, 2010). O metabolismo dos carboidratos apresenta estreita relação com doenças, como o diabetes mellitus tipo 2 (DM-2) (AFOLABI; OLOYEDE; AGUNBIÁDE, 2018).

As lipases gástrica e pancreática são enzimas que digerem lipídios da dieta, como os triacilgliceróis. No estômago, a lipase gástrica gera diacilgliceróis e ácidos graxos, enquanto, no intestino delgado, a lipase pancreática produz monoacilglicerol e ácidos graxos para serem absorvidos pelos enterócitos. Após a absorção, os ácidos graxos penetram nas células onde são reesterificados em triacilgliceróis, armazenando-se, principalmente, nos tecidos adiposos (KO et al., 2020). No entanto, complicações decorrentes do metabolismo lipídico, como as dislipidemias, podem ocasionar doenças cardiovasculares (DCV) e cerebrovasculares (RHEE et al., 2019; ADNAN et al., 2018).

A absorção de nutrientes também está relacionada ao sobrepeso e à obesidade, elevando o risco do desenvolvimento de DM-2, dislipidemias, doenças cardiovasculares e outros distúrbios que caracterizam a síndrome metabólica (ZIELINSKA-BLIZNIEWSKA et al., 2019). Esses distúrbios envolvem o armazenamento lipídico no tecido adiposo que

ainda exerce função endócrina por secretar hormônios, enzimas, fatores de crescimento e citocinas, causando inflamação crônica e resistência à insulina (MCARDLE et al., 2013).

A estreita relação entre os diferentes distúrbios do metabolismo (obesidade, diabetes mellitus, dislipidemias e doenças cardiovasculares) pode apresentar como estratégia de tratamento a inibição de enzimas digestivas. A acarbose, a voglibose e o miglitol, por exemplo, são fármacos hipoglicemiantes orais que inibem a  $\alpha$ -glicosidase e/ou  $\alpha$ -amilase pancreática (JONGKEES et al., 2017), enquanto o orlistat é um inibidor seletivo das lipases (LIU et al., 2020; TEKULU; ARAYA; MENGESHA, 2019).

O objetivo deste capítulo foi realizar uma revisão atualizada sobre as funções fisiológicas e os distúrbios fisiopatológicos associados direta ou indiretamente com as enzimas digestivas ( $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glicosidase e lipase), destacando os fármacos usados no tratamento destes distúrbios.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

O propósito deste capítulo foi revisar as funções das enzimas digestivas nos contextos fisiológicos e fisiopatológicos. Para isto, a metodologia do estudo teve como base o uso de Descritores em Ciências da Saúde (DeCS), como enzimas digestivas, lipase pancreática,  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glicosidase, síndrome metabólica, dislipidemias e diabetes. A Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (Lilacs) via Biblioteca Virtual em Saúde, o portal Pubmed gerenciado pelo *US National Library of Medicine/National Institutes of Health* e o Portal Periódicos Capes foram as principais plataformas científicas usadas nesta pesquisa, que foi realizada entre agosto de 2019 e dezembro de 2020.

Os seguintes critérios de inclusão foram adotados para a escolha dos documentos científicos: identificações completas, idiomas em português, inglês e espanhol, as descrições dos estudos (pleno, curta comunicação, revisão, relato de casos, notas científicas, etc.), publicados em periódicos indexados e disponíveis em plataformas científicas, teses, dissertações e livros. Além disso, a confiabilidade e a fidelidade das fontes, assim como a veracidade documental foram analisadas. Os critérios de exclusão envolveram documentos não indexados e referências com identificação duvidosa. Cada referência foi apreciada quanto ao título da obra, autores, fundamentos, objetivos, metodologias, resultados e conclusões. Os conceitos foram definidos a partir de um consenso de uma ou mais obras (SOARES et al., 2018).

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Funções da $\alpha$ -Amilase E $\alpha$ -Glicosidase

Os carboidratos abrangem um grupo diversificado de moléculas que podem ser classificadas em mono- e dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos. Como um dos

principais carboidratos da alimentação humana, o amido proporciona a porcentagem mais elevada de energia da dieta, representando cerca de 60 a 70% do total de calorias ingeridas. Esse carboidrato é um polímero constituído por dois tipos de polissacarídeos de origem vegetal, a amilose e a amilopectina. A amilose é um polímero linear com aproximadamente 1.000 moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4, enquanto a amilopectina possui cerca de 100.000 moléculas de glicose unidas predominantemente por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 e também ligações  $\alpha$ -1,6, resultando em uma estrutura ramificada (LAPIS et al., 2017) (Figura 1).

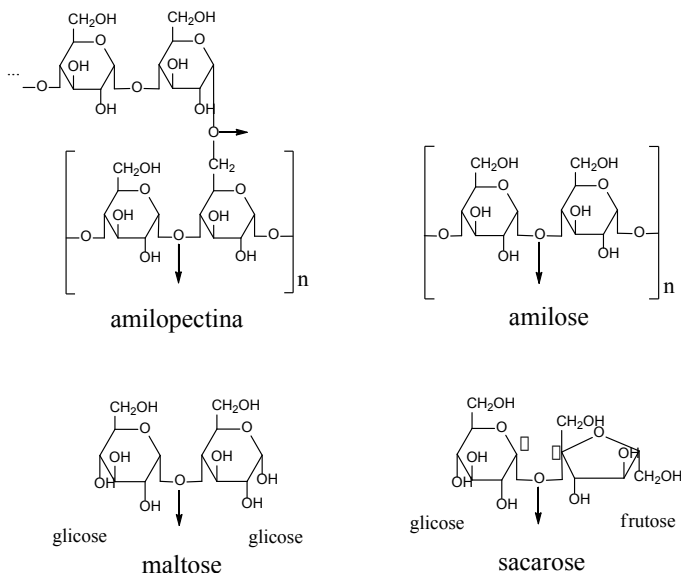


Figura 1 - Diagrama das estruturas das ligações glicosídicas de frações de carboidratos polissacarídeos e dissacarídeos hidrolisados pela  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase.

As enzimas  $\alpha$ -amilase salivar e pancreática ( $\alpha$ -1,4-glicano-4-glicano-hidrolases) pertencem à família 13 das glicosídeo-hidrolases (LO PIPARO et al., 2008). Como endo-hidrolases, clivam as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 internas do amido (GOODMAN, 2010), gerando dextrinas lineares e ramificadas. Nos seres humanos, são codificadas por cinco genes no cromossomo 1, os genes AMY1A, AMY1B e AMY1C ( $\alpha$ -amilase salivar) e AMY2A e AMY2B ( $\alpha$ -amilase pancreática). Essas isoenzimas são constituídas por 496 aminoácidos em uma única cadeia polipeptídica com alta homologia em suas estruturas, 97% de similaridade na sequência de aminoácidos e 92% nos domínios catalíticos (LO PIPARO et al., 2008).

As  $\alpha$ -glicosidases ( $\alpha$ -D-glicosídeo glicohidrolase) pertencem ao subgrupo 1 da família 31 das glicosídeo-hidrolases que catalisam a hidrólise das extremidades não redutoras das

dextrinas em glicose. Nos mamíferos, essas enzimas formam um complexo (sacarase-isomaltase e maltase-glicoamilase) na membrana do epitélio do intestino delgado (SIM et al., 2008). A maltase hidrolisa as ligações  $\alpha$ -1,4 entre as moléculas de glicose da maltose ou das extremidades do polissacarídeo. Já a sacarase-isomaltase é um complexo formado pela isomaltase (dextrinase), responsável pela hidrólise das ligações  $\alpha$ -1,6 das dextrinas e  $\alpha$ -1,4 da maltose e maltotriose, associada à sacarase, que hidrolisa as ligações  $\alpha$ -1,2 da sacarose (glicose e frutose) (GOODMAN, 2010). Essas enzimas têm sua composição e estrutura similares, apresentando cerca de 60% de homologia (SIM et al., 2008).

O amido inicia sua digestão pela ação da  $\alpha$ -amilase salivar que hidrolisa as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 internas, formando oligômeros curtos. No intestino, esses oligômeros sofrem ação da  $\alpha$ -amilase pancreática que cliva em malto-oligossacarídeos lineares (maltose e maltotriose) e dextrinas. Então, a sacarase-isomaltase e a maltase-glicoamilase, enzimas  $\alpha$ -glicosidases da membrana apical dos enterócitos, hidrolisam os malto-oligossacarídeos em glicose (NICHOLS et al., 2003), que será absorvida para o interior do enterócito através do cotransportador sódio-glicose (SGLT1), seguida para a circulação pelo transportador de glicose 2 (GLUT2) acarretando em hiperglicemia pós-prandial (KELLETT; BROTT-LAROCHE, 2005) (Figura 2).

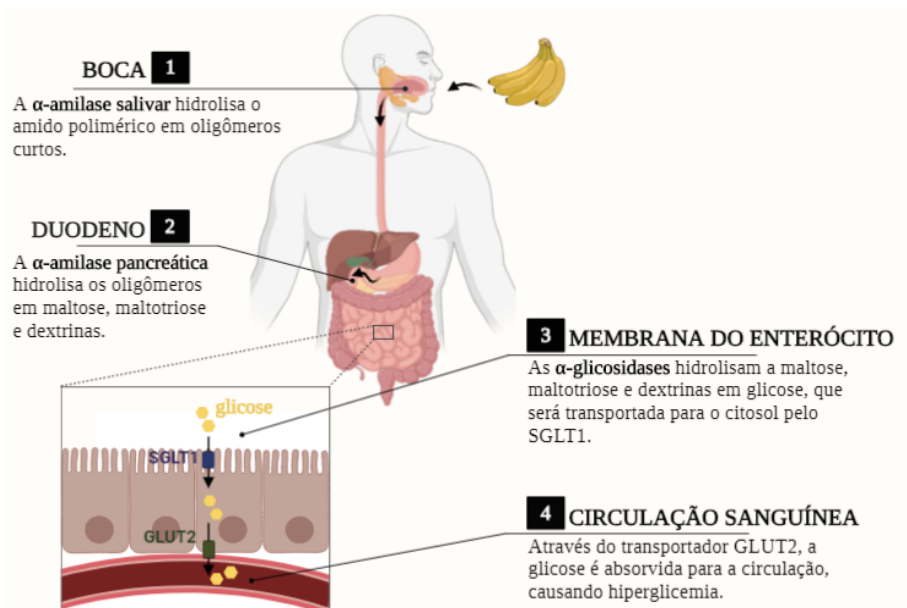


Figura 2 - Representação esquemática dos processos de digestão do amido e absorção de glicose.

## 3.2 Funções das lipases

O triacilglicerol (TAG) é a principal gordura ingerida através da alimentação e armazenada no organismo. A molécula do triacilglicerol é constituída por três ácidos graxos, geralmente distintos, esterificados aos grupos hidroxila da molécula de glicerol (BELMONTE; AOKI, 1983) (Figura 3).

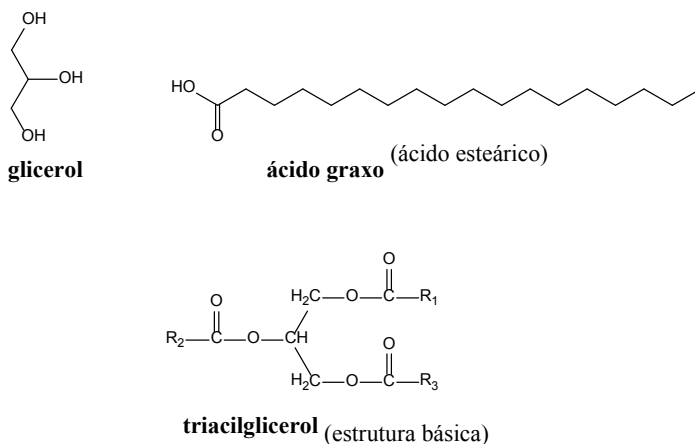


Figura 3 - Diagrama das estruturas químicas do glicerol, ácido graxo e triacilglicerol.

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases) (BOUCHAËLA et al., 2015) são uma família de enzimas que catalisam a hidrólise das ligações éster dos triacilglicerídeos, fosfolipídios e ésteres de colesterol (WONG; SCHOTZ, 2002), compreendendo a lipase gástrica, lipase pancreática, lipase pancreática relacionada à proteína 1, lipase pancreática relacionada à proteína 2, lipase lipoproteica, lipase hepática, lipase endotelial e fosfatidilserina fosfolipase A1 (JIN et al., 2002). A lipase gástrica (lipase ácida) age em pH ideal de 4,0, sendo mais eficaz na hidrólise de triacilgliceróis compostos por ácidos graxos de cadeias médias. Já a lipase pancreática é a enzima mais importante do processo de digestão dos lipídios no TGI (KO et al., 2020).

A digestão do triacilglicerol (TAG) inicia-se no estômago pela ação da lipase gástrica, gerando diacilglicerol e ácido graxo na forma de uma emulsão. Ao atingir o intestino delgado, ocorre mais emulsificação pelos ácidos biliares, facilitando a ação da lipase pancreática. Então, a lipase pancreática hidrolisa os TAGs em monoacilglicerol e ácidos graxos, que são absorvidos pelos enterócitos por difusão passiva ou transportador (KO et al., 2020). No sangue, os ácidos graxos de cadeia curta e média (até 12 átomos de carbono) são transportados pela albumina, enquanto os de cadeia longa (acima de 12 átomos de carbono) são convertidos a TAG para serem carreados por lipoproteínas (SOBCZAK; BLINDAUER; STEWART, 2019).



Cabe destacar que, dentro dos enterócitos, os monoacilgliceróis e ácidos graxos de cadeia longa são transportados para o retículo endoplasmático, onde serão ressintetizados em TAG através da via dos monoacilgliceróis. Neste processo, as monoacilglicerol aciltransferases catalisam a formação de diacilgliceróis a partir da esterificação de monoacilgliceróis com acil-CoA. Então, sob ação das enzimas diacilglicerol aciltransferases, as moléculas de diacilglicerol são esterificadas com moléculas de acil-CoA, gerando o TAG. Após essa ressíntese, os TAGs podem ser inseridos como lipoproteínas, principalmente os quilomícrons, ou armazenados no citosol. Os quilomícrons são secretados através da membrana basolateral dos enterócitos e irão para a circulação através do sistema linfático (KO et al., 2020).

A lipase lipoproteica (LPL), enzima presente em vários tipos celulares e nos capilares sanguíneos, promove a hidrólise dos triacilgliceróis, presentes nos quilomícrons e nas lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), em ácidos graxos que podem ser oxidados para fornecer energia ou penetrar nas células e ser novamente reesterificados em triacilgliceróis para armazenamento (Figura 4). Dessa forma, os triacilgliceróis representam a principal forma de armazenamento de lipídios no organismo, sendo que, em mamíferos, são estocados intracelularmente no tecido adiposo (HE et al., 2018).

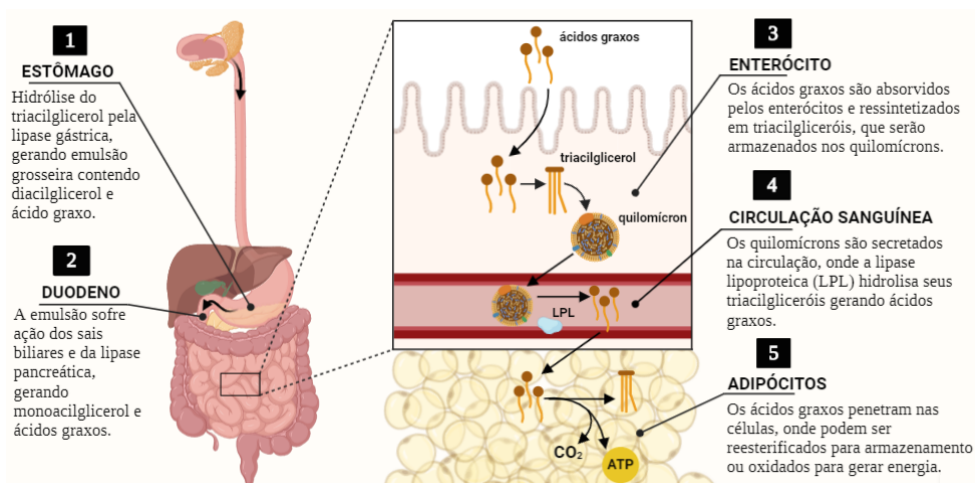


Figura 4 - Representação esquemática do processo de digestão do triacilglicerol.

### 3.3 Síndrome Metabólica

A síndrome metabólica (SM), também conhecida como “síndrome da resistência à insulina” e “síndrome X”, é considerada como um conjunto de distúrbios metabólicos que inclui obesidade central, resistência à insulina (diabetes mellitus tipo 2, glicemia de jejum alterada e tolerância à glicose diminuída), dislipidemia aterogênica e hipertensão arterial,

estando relacionada com risco aumentado de desenvolvimento de doença cardiovascular aterosclerótica (ROCHLANI et al., 2017). A patogênese da SM é complexa e ainda não está totalmente elucidada, entretanto, sabe-se que os fatores genéticos e o estilo de vida baseado em consumo excessivo de calorias e ausência de atividade física contribuem para a adiposidade visceral, que é mais preponderante no mecanismo de resistência à insulina do que a gordura subcutânea (ROCHLANI et al., 2017).

Vários mecanismos são propostos para a patogênese da SM, mas acredita-se que a relação existente entre a resistência à insulina e a circulação de ácidos graxos livres desempenhe um papel fundamental. Isso porque a resistência à insulina aumenta o processo de lipólise e, conseqüentemente, aumenta a circulação de ácidos graxos livres, que estão relacionados à elevação de triglicerídeos e VLDL pelo fígado (MCCRACKEN; MONAGHAN; SREENIVASAN, 2018). Além disso, o estresse oxidativo e a inflamação crônica de baixo grau também são considerados mecanismos potenciais, principalmente no processo aterosclerótico (ROCHLANI et al., 2017).

A terapia farmacológica da SM é baseada nas patologias associadas, já que não existe um tratamento único. Isso requer o uso prolongado de vários medicamentos, o que se torna um desafio para os pacientes e coloca em risco a adesão (ROCHLANI et al., 2017). Entre os medicamentos usados para reduzir a morbidade, a mortalidade cardiovascular e renal e prevenir o agravamento metabólico da SM, destacam-se os diuréticos, anti-hipertensivos, antidiabéticos orais (biguanidas, tiazolidinedionas ou glitazonas, inibidores da alfa-glicosidase e sulfonilureias), antilipídêmicos (estatinas, fibratos, ácido nicotínico e outros) e inibidor da lipase pancreática (orlistat).

### 3.4 Inflamação, Resistência À Insulina e Obesidade

O tecido adiposo ocorre em duas formas distintas, o tecido adiposo marrom (*brown adipose tissue* [BAT]) e o tecido adiposo branco (*white adipose tissue* [WAT]). O BAT é responsável pela termogênese para o controle da temperatura corporal, enquanto o WAT possui a função de armazenamento lipídico na forma de triacilglicerídios (MCARDLE et al., 2013). Além disso, o WAT é considerado um órgão endócrino, pois secreta na circulação sanguínea substâncias como hormônios, enzimas, fatores de crescimento, proteínas da matriz e citocinas (ZIELINSKA-BLIZNIEWSKA et al., 2019).

Citocinas secretadas pelo tecido adiposo são denominadas adipocitocinas ou adipocinas, e podem ser anti-inflamatórias, que são mediadoras de processos fisiológicos, ou pró-inflamatórias, que estimulam as vias inflamatórias. Adiponectina, fator de transformação de crescimento beta (TGF- $\beta$ ), interleucinas (IL) IL-10, IL-4, IL-13, receptor antagonista de IL-1 (IL-1Ra) e apelina são as adipocinas anti-inflamatórias, enquanto IL-6, IL-1 $\beta$ , fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), leptina, visfatina, resistina, angiotensina II e inibidor do ativador de plasminogênio 1 são pró-inflamatórias (ZIELINSKA-BLIZNIEWSKA et al., 2019). Dentre essas proteínas, IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  têm sido relacionadas ao

desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 (DM-2) (YANAI; YOSHIDA, 2019).

IL-6 é uma citocina secretada por células do sistema imunológico (monócitos, macrófagos e linfócitos), fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, algumas células tumorais e células do WAT. Sua produção é regulada por fatores, como IL-1, TNF- $\alpha$ , interferons, DNA e RNA de vírus e endotoxinas de bactérias (YAO et al., 2014), e sua ação aumenta a produção de proteínas de fase aguda (como a proteína C reativa), fibrinogênio (estado pró-trombótico), expressão de moléculas de adesão e ativação do sistema renina-angiotensina (ROCHLANI et al., 2017). IL-6 também promove a fosforilação da serina do substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1) e, portanto, traz impactos negativos à sinalização da insulina (MCARDLE et al., 2013).

IL-1 $\beta$  é um mediador pró-inflamatório da resposta inflamatória sistêmica e seus níveis aumentados na circulação estão relacionados ao maior risco de desenvolvimento de DM-2 (HERNANDEZ-SANTANA et al., 2019; MCARDLE et al., 2013). Como citocina pró-inflamatória, o TNF- $\alpha$ , secretado por monócitos e macrófagos, estimula a liberação de IL-6 e IL-1 $\beta$ , responde às infecções e lesões, apoptose e angiogênese (MCARDLE et al., 2013) e é citotóxico para células tumorais (BORST, 2004). Além disso, TNF- $\alpha$  induz a fosforilação e inativação dos receptores de insulina nos tecidos adiposo e muscular liso, estando associado com a resistência à insulina induzida pela obesidade, (ROCHLANI et al., 2017) e também estimula a lipólise, que aumenta os ácidos graxos livres circulantes (MCARDLE et al., 2013).

A obesidade é definida como uma expansão e disfunção dos tecidos adiposos ocasionadas sob condições positivas de energia, que estimulam os pré-adipócitos a se diferenciar e proliferar em adipócitos maduros, aumentando o número de células (hiperplasia) e o tamanho das células (hipertrofia), devido ao armazenamento lipídico em excesso. Como o tecido adiposo é um órgão endócrino capaz de secretar substâncias regulatórias, sua expansão gera um aumento na liberação das citocinas pró-inflamatórias. Essas citocinas estimulam respostas do sistema imunológico e promovem a infiltração de células como macrófagos ativos, causando um processo inflamatório crônico de baixo grau (LIU; WANG; LIN, 2019) (Figura 5). Além disso, os fatores pró-inflamatórios ativam várias serina-quinases, como I $\kappa$ B quinase (IKK) e c-Jun N-terminal quinase (JNK), que promovem a fosforilação dos resíduos de serina na via de sinalização da insulina, inclusive a serina do IRS-1. Consequentemente, a sinalização normal da insulina é prejudicada promovendo estado de resistência, o que favorece o desenvolvimento de várias complicações, inclusive o DM-2 (MCARDLE et al., 2013).

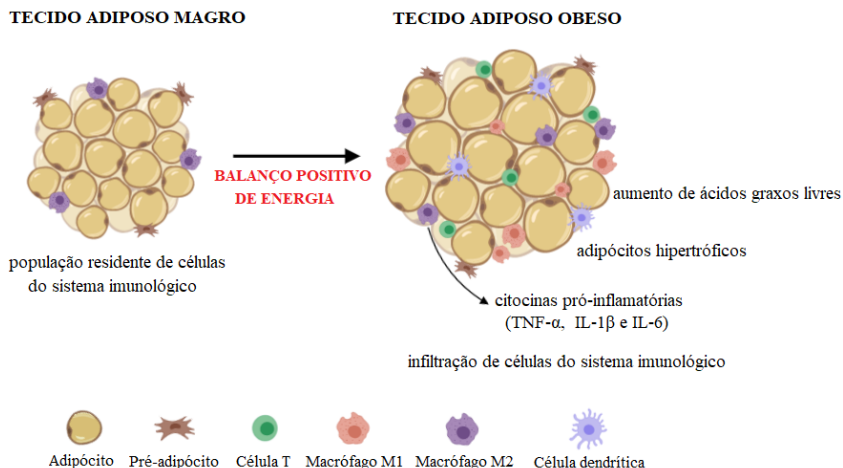


Figura 5 - Expansão do tecido adiposo e infiltração de células do sistema imunológico.

O tratamento da obesidade é baseado principalmente na combinação de mudança de hábitos alimentares e atividade física. Entretanto, os indivíduos que não respondem a essas modificações podem necessitar de terapia farmacológica (ZIELINSKA-BLIZNIEWSKA et al., 2019). Atualmente, estão disponíveis os seguintes fármacos e associações: inibidores das lipases gastrointestinais (orlistat e cetilistat) e supressores do apetite, como sibutramina (inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina), liraglutida (agonista do receptor GLP-1 [*glucagon-like peptide-1*]), fentermina (inibidor do transportador de noradrenalina), fentermina/topiramato (inibidor do transportador de noradrenalina e agonista receptores GABA, respectivamente), lorcaserina (agonista de receptor 5-HT), naltrexona/bupropiona (antagonista de receptor opióide e inibidor da recaptação de noradrenalina e dopamina, respectivamente), tesofensina (inibidor da recaptação de noradrenalina, dopamina e serotonina) e exenatida (agonista GLP-1) (NARAYANASWAMI; DWOSKIN, 2017).

### 3.5 Resistência à insulina e dislipidemias

Os ácidos graxos (AG) que são estocados intracelularmente como TAGs podem ser mobilizados pelo processo de lipólise através de sua hidrólise (SOBCZAK; BLINDAUER; STEWART, 2019). A insulina, por sua vez, além de estimular a captação de glicose pelas células e inibir a gliconeogênese, também é capaz de inibir a lipólise. Desse modo, a resistência à insulina prejudica a inibição da lipólise e gera um aumento de AG circulantes (ROCHLANI et al., 2017). O excesso de AG nas células e tecidos ocasiona a lipotoxicidade e sobrecarga e impossibilita os processos de conversão para TAG ou  $\beta$ -oxidação, formando lipídios tóxicos. Consequentemente, há disfunção mitocondrial, estresse do retículo endoplasmático e geração de espécies reativas de oxigênio, que resultam em apoptose (principalmente células  $\beta$ -pancreáticas, musculares esqueléticas e adipócitos), inflamação

e resistência à insulina (SOBCZAK; BLINDAUER; STEWART, 2019).

No fígado, os AG circulantes são substratos para produção de TAGs (HUANG, 2009). Em condições normais, grande parte da apolipoproteína B (apoB) sintetizada é degradada pelo retículo endoplasmático dos hepatócitos. Quando os níveis de TAG estão aumentados no fígado, há uma supressão da degradação de apoB (HIRANO, 2018), principal apolipoproteína presente nas partículas de VLDL, causando aumento na produção de VLDL. Além disso, a insulina também está associada à degradação de apoB, através de uma via dependente da PI3-K e, portanto, a resistência à insulina está diretamente relacionada ao aumento na produção de VLDL (HUANG, 2009).

A LPL, presente na superfície do endotélio vascular, é responsável pela hidrólise de TAGs transportados pelos quilomícrons e VLDL, desempenhando um papel importante na remoção dessas partículas (HIRANO, 2018). A insulina estimula a ação da LPL e o estado de resistência reduz a atividade da enzima, resultando em níveis elevados de quilomícrons e VLDL. Dessa forma, indivíduos com DM-2 frequentemente também apresentam níveis de quilomícrons elevados. Portanto, a hipertrigliceridemia é uma consequência tanto do aumento da produção de TAGs quanto da redução do seu catabolismo, ambos promovidos pela resistência à insulina (HUANG, 2009).

O VLDL é metabolizado em partículas de LDL denominadas “pequenas e densas” (SdLDL, *small dense LDL*), além das lipoproteínas remanescentes (HUANG, 2009). Isso ocorre porque há uma transferência de TAGs do VLDL para o LDL, através da proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP), sendo que o LDL rico em TAGs sofre lipólise pela lipase hepática tornando-se pobre em colesterol e formando o SdLDL. Em comparação às partículas de LDL grandes, o SdLDL está mais fortemente associado ao desenvolvimento de aterosclerose, pois penetra mais facilmente na parede das artérias, possui meia-vida plasmática mais longa, menor afinidade com o receptor de LDL e fraca resistência ao estresse oxidativo (HIRANO, 2018).

De forma semelhante, as partículas de HDL também recebem TAGs transferidos do VLDL pela CETP, em troca dos ésteres de colesterol. Portanto, são formadas partículas de HDL ricas em TAGs, o que as tornam substratos melhores para a lipase hepática, sendo rapidamente eliminadas da circulação (HUANG, 2009). Com menos partículas de HDL circulantes, há uma redução no transporte reverso de colesterol dos tecidos, responsável por prevenir o desenvolvimento de DCV (HIRANO, 2018).

O tratamento das dislipidemias é uma abordagem crucial para a prevenção de DCV, e engloba mudanças no estilo de vida e terapia farmacológica (THOMPSON, 2004). Atualmente, as principais classes de fármacos e suas associações são: estatinas (inibidores da 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A [HMG-CoA] redutase), limitam a síntese de colesterol endógeno; fibratos ou derivados do ácido fibríco, estimulam os receptores gama ativados por proliferador de peroxissomo (PPAR- $\gamma$ ), atuando no metabolismo lipídico e aumentando a atividade da LPL (KHERA; MCGUIRE, 2005); ezetimiba (inibidor da

proteína NPCL1), inibem a absorção intestinal de colesterol; inibidores da PCSK9, proteína envolvida na homeostase do colesterol pela degradação de receptores LDL; estatina/ezetimiba; estatina/fibrato (FILIPPATOS et al., 2017); ácido nicotínico ou niacina, inibe a lipólise (JULIUS, 2015).

### 3.6 Diabetes mellitus tipo 2

O diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico caracterizado por concentrações elevadas de glicose no sangue (hiperglicemia), devido à insuficiência na produção de insulina pelas células  $\beta$ -pancreáticas e/ou deficiência na sua ação (resistência à insulina), podendo ser classificado em: diabetes mellitus tipo 1, ou insulino-dependente, quando há destruição das células  $\beta$ -pancreáticas pelo sistema imunológico; diabetes mellitus tipo 2 (DM-2), ou não insulino-dependente, quando há deficiência na secreção ou resistência à insulina; diabetes gestacional, quando a intolerância à glicose é detectada pela primeira vez no período gestacional (ASMAT; ABAD; ISMAIL, 2016); e LADA (diabetes auto-imune latente do adulto), quando o DM tipo 1 se inicia na fase adulta (SCHWARTZ et al., 2017). Por fim, o diabetes *insipidus* é uma doença rara causada pela diminuição na secreção ou ação da vasopressina que leva à excreção de grandes volumes de urina (REFARDT; WINZELER; CHRIST-CRAIN, 2020).

DM-2 é caracterizado por hiperglicemia crônica como consequência da resistência periférica à insulina, disfunção das células  $\beta$ -pancreáticas ou ambas as situações (MEZA et al., 2019). Os tecidos que apresentam resistência à insulina de forma mais proeminente são o fígado, músculo esquelético e tecido adiposo (FORBES; COOPER, 2013). Como consequência, a captação e utilização de glicose pelas células são afetadas, resultando em aumento da lipólise e proteólise, aumento da gliconeogênese hepática, liberação de hormônios catabólicos (como glucagon, cortisol e catecolaminas), aumento na produção de superóxido e estresse oxidativo, aumento de disfunção endotelial e mitocondrial, aumento na acidose intracelular no cérebro e danos neuronais (RASOULI et al., 2020).

Dessa forma, várias complicações estão associadas ao DM-2. As complicações metabólicas agudas incluem a cetoacidose diabética, devido à hiperglicemia grave, e coma, como consequência da hipoglicemia. Já as complicações de longo prazo estão relacionadas com danos aos vasos sanguíneos desencadeados pela hiperglicemia crônica, sendo macrovasculares (hipertensão, doença coronariana, ataque cardíaco, derrame, doença vascular cerebral e doença vascular periférica), quando há danos nas artérias, e microvasculares (nefropatia, retinopatia e neuropatia), quando pequenos vasos sanguíneos são acometidos (FORBES; COOPER, 2013).

O manejo terapêutico adequado do DM-2 é importante na prevenção dessas complicações (RASOULI et al., 2020). O tratamento farmacológico compreende as seguintes classes de medicamentos: biguanidas (metformina), reduzem a produção hepática de glicose e a absorção de glicose pelo intestino e estimula captação de glicose pelos tecidos;

sulfoniuréias (glibenclamida, gliclazida, glimepirida, glipizida e clorpropamida), agem diretamente nas células  $\beta$ -pancreáticas bloqueando os canais de potássio dependente de ATP e estimulando a secreção de insulina; tiazolidinedionas (pioglitazona, rosiglitazona e troglitazona), são agonistas dos receptores PPAR- $\gamma$  e sensibilizam a ação da insulina nos hepatócitos, adipócitos e músculo esquelético; agonistas do receptor GLP-1 (liraglutida, exenatida e lixisenatida), hormônio que estimula a secreção de insulina e inibe a secreção de glucagon; inibidores da DDP-4 (dipeptidil-peptidase 4) (vildagliptina, sitagliptina, saxagliptina e linagliptina), enzima que metaboliza o GLP-1; inibidores SGLT-2 (co-transportador sódio-glicose 2), impedem a reabsorção de glicose pelo SGLT-2 nos rins; inibidores da  $\alpha$ -glicosidase (acarbose, voglibose e miglitol), enzima responsável por hidrolisar oligo e dissacarídeos em glicose, promovendo a hiperglicemia pós-prandial (WU et al., 2014).

## 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente capítulo descreveu as funções fisiológicas das enzimas digestivas ( $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glicosidase e lipase) e os distúrbios direta ou indiretamente associados, enfocando os principais fármacos usados no tratamento dessas complicações. Essas enzimas estão envolvidas nos processos digestivos através de reações que catalisam a quebra de carboidratos e gorduras, transformando em estruturas mais simples a serem captadas pelos tecidos.

Entre os distúrbios associados com as enzimas digestivas, a síndrome metabólica consiste de um conjunto de complicações orgânicas que inclui obesidade central, resistência à insulina, dislipidemia aterogênica e hipertensão arterial. Com distúrbio ligado ao metabolismo, a obesidade constitui uma disfunção do tecido adiposo causada, normalmente, por um consumo excessivo de calorias alimentares. Consequentemente, ocorre a secreção de substâncias regulatórias que liberam citocinas pró-inflamatórias que desencadeiam processo inflamatório crônico, levando ao surgimento de DM-2 e doenças cardiovasculares. Por sua vez, a dislipidemia, geralmente, está relacionada à elevação de colesterol e triglicerídeos no plasma e/ou a diminuição dos níveis de HDL que contribuem para aterosclerose. No entanto, o aumento de AG circulantes pode resultar em apoptose (principalmente de células  $\beta$ -pancreáticas, musculares esqueléticas e adipócitos), inflamação e resistência à insulina. Neste contexto, esses distúrbios envolvem o aparecimento da DM-2 que se caracteriza por concentrações elevadas de glicose no sangue (hiperglicemia) devido à insuficiência na secreção de insulina pelas células  $\beta$ -pancreáticas e/ou resistência à insulina.

Quando associados, os distúrbios metabólicos causam grandes consequências aos seres humanos, necessitando, entre outros, de tratamento farmacológico. Entre as classes de fármacos usadas no tratamento das complicações metabólicas, destacam-se



os inibidores da  $\alpha$ -glicosidase (acarbose, voglibose e miglitol) e lipase (orlistat e cetilistat).

## REFERÊNCIAS

ADNAN, T.; AHMAD, M.; CHAUDHRI, W. M.; ZIL-E-ALI, A.; GONDAL, M. U. M.; ALI, S. M. H.; NUSRAT, M.; WASIQ, S. Pathophysiology of dyslipidemia and its management by PCSK9 inhibitors: A literature review. **Internal Medicine and Medical Investigation Journal**, v. 3, n. 3, p. 92-99, 2018.

AFOLABI, O. B.; OLOYEDE, O. I.; AGUNBIADE, S. O. Inhibitory potentials of phenolic-rich extracts from *Bridelia ferruginea* on two key carbohydrate-metabolizing enzymes and Fe<sup>2+</sup>-induced pancreatic oxidative stress. **Journal of Integrative Medicine**, v. 16, n. 3, p. 192-198, 2018.

ASMAT, U.; ABAD, K.; ISMAIL, K. Diabetes mellitus and oxidative stress - A concise review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 5, p. 547-553, 2016.

BELMONTE, M. A.; AOKI, M. S. Triacilglicerol intramuscular: um importante substrato energético para o exercício de endurance. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 11, n. 2, p. 135-140, 2005.

BORST, S. E. The role of TNF- $\alpha$  in insulin resistance. **Endocrine**, v. 23, n. 2-3, p. 177-182, 2004.

BOUCHAËLA, E.; BOUALI, M.; ALI, Y. B.; MILED, N.; GARGOURI, Y.; FENDRI, A. Biochemical characterization and molecular modeling of pancreatic lipase from a cartilaginous fish, the common stingray (*Dasyatis pastinaca*). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, n. 1, p. 151-169, 2015.

FILIPPATOS, T. D.; FLORENTIN, M.; GEORGOULA, M.; ELISAF, M. S. Pharmacological management of diabetic dyslipidemia. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 10, n. 2, p. 187-200, 2017.

FORBES, J. M.; COOPER, M. E. Mechanisms of diabetic complications. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 1, p. 137-188, 2013.

GOODMAN, B. E. Insights into digestion and absorption of major nutrients in humans. **Advances in Physiology Education**, v. 34, n. 2, p. 44-53, 2010.

HARTENSTEIN, V.; MARTINEZ, P. Structure, development and evolution of the digestive system. **Cell and Tissue Research**, v. 377, p. 289-292, 2019.

HE, P-P.; JIANG, T.; OUYANG, X-P.; LIANG, Y-Q.; ZOU, J-Q.; WANG, Y.; SHEN, Q-Q.; LIAO, L.; ZHENG, X-L. Lipoprotein lipase: Biosynthesis, regulatory factors, and its role in atherosclerosis and other diseases. **Clinica Chimica Acta**, v. 480, p. 126-137, 2018.

HIRANO, T. Pathophysiology of diabetic dyslipidemia. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 25, n. 9, p. 771-782, 2018.

HUANG, P. L. A comprehensive definition for metabolic syndrome. **Disease models & mechanisms**, v. 2, n. 5-6, p. 231-237, 2009.

JANIAC, M. C. Digestive enzymes of human and nonhuman primates. **Evolutionary Anthropology**, v. 25, n. 5, p. 253-266, 2016.



- JIN, W.; BROEDL, U. C.; MONAJEMI, H.; GLICK, J. M.; RADER, D. J. Lipase H, a new member of the triglyceride lipase family synthesized by the intestine. **Genomics**, v. 80, n. 3, p. 268-273, 2002.
- JONGKEES, S. A. K.; CANER, S.; TYSOE, C.; BRAYER, G. D.; WITHERS, S. G.; SUGA, H. Rapid discovery of potent and selective glycosidase-inhibiting de novo peptides. **Cell Chemical Biology**, v. 24, n. 3, p. 381-390, 2017.
- JULIUS, U. Niacin as antidyslipidemic drug. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 93, n. 12, p. 1043-1054, 2015.
- KELLETT, G. L.; BROT-LAROCHE, E. Apical GLUT2: a major pathway of intestinal sugar absorption. **Diabetes**, v. 54, n. 10, p. 3056-3062, 2005.
- KHERA, A.; MCGUIRE, D. K. Management of diabetic dyslipidemia. **American Journal of Cardiovascular Drugs**, v. 5, n. 2, p. 83-91, 2005.
- KO, C. W.; QU, J.; BLACK, D. D.; TSO, P. Regulation of intestinal lipid metabolism: current concepts and relevance to disease. **Nature Reviews: Gastroenterology & Hepatology**, v. 17, n. 3, p. 169-183, 2020.
- LAPIS, T. J.; PENNER, M. H.; BALTO, A. S.; LIM, J. Oral digestion and perception of starch: effects of cooking, tasting time, and salivary  $\alpha$ -amylase activity. **Chemical Senses**, v. 42, n. 8, p. 635-645, 2017.
- LIU, T-T.; LIU, X-T.; CHEN, Q-X.; SHI, Y. Lipase inhibitors for obesity: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 128, p. 1-9, 2020.
- LO PIPARO, E.; SCHEIB, H.; FREI, N.; WILLIAMSON, G.; GRIGOROV, M.; CHOU, C. J. Flavonoids for controlling starch digestion: structural requirements for inhibiting human  $\alpha$ -amylase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 12, p. 3555-3561, 2008.
- MCARDLE, M. A.; FINUCANE, O. M.; CONNAUGHTON, R. M.; MCMORROW, A. M.; ROCHE, H. M. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. **Frontiers in Endocrinology**, v. 4, article 52, 2013.
- MCCRACKEN, E.; MONAGHAN, M.; SREENIVASAN, S. Pathophysiology of the metabolic syndrome. **Clinics in dermatology**, v. 36, n. 1, p. 14-20, 2018.
- MEZA, C. A.; LA FAVOR, J. D.; KIM, D-H.; HICKNER, R. C. Endothelial dysfunction: is there a hyperglycemia-induced imbalance of NOX and NOS?. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 15, p. 3775, 2019.
- NARAYANASWAMI, V.; DWOSKIN, L. P. Obesity: Current and potential pharmacotherapeutics and targets. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 170, p. 116-147, 2017.
- NICHOLS, B. L.; AVERY, S.; SEN, P.; SWALLOW, D. M.; HAHN, D.; STERCHI, E. The maltase-glucoamylase gene: common ancestry to sucrase-isomaltase with complementary starch digestion activities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 3, p. 1432-1437, 2003.

RASOULI, H.; YARANI, R.; POCIOT, F.; POPOVIĆ-DJORDJEVIĆ, J. Anti-diabetic potential of plant alkaloids: Revisiting current findings and future perspectives. **Pharmacological Research**, 104723, 2020.

REFARDT, J.; WINZELER, B.; CHRIST-CRAIN, M. Diabetes insipidus: An update. **Endocrinology and Metabolism Clinics**, v. 49, n. 3, p. 517-531, 2020.

RHEE, E.-J.; KIM, H. C.; KIM, J. H.; LEE, E. Y.; KIM, B. J.; KIM, E. M.; SONG, Y. J.; LIM, J. H.; KIM, H. J.; CHOI, S.; MOON, M. K.; NA, J. O.; PARK, K.-Y.; OH, M. S.; HAN, S. Y.; NOH, J.; YI, K. H.; LEE S.-H.; HONG, S.-C.; JEONG, I.-K. 2018 Guidelines for the management of dyslipidemia. **Korean Journal of Internal Medicine**, v. 34, n. 4, p. 723-771, 2019.

ROCHLANI, Y.; POTHINENI, N. V.; KOVELAMUDI, S.; MEHTA, J. L. Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. **Therapeutic advances in cardiovascular disease**, v. 11, n. 8, p. 215-225, 2017.

SCHWARTZ, S. S.; EPSTEIN, S.; CORKEY, B. E.; GRANT, S. F.; GAVIN III, J. R.; AGUILAR, R. B.; HERMAN, M. E. A unified pathophysiological construct of diabetes and its complications. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 28, n. 9, p. 645-655, 2017.

SIM et al., L.; QUEZADA-CALVILLO, R.; STERCHI, E. E.; NICHOLS, B. L.; ROSE, D. R. Human intestinal maltase-glucoamylase: crystal structure of the N-terminal catalytic subunit and basis of inhibition and substrate specificity. **Journal of Molecular Biology**, v. 375, n. 3, p. 782-792, 2008.

SOARES, S. V.; PICOLLI, I. R. A.; CASAGRANDE, J. L. Pesquisa bibliográfica, pesquisa bibliométrica, artigo de revisão e ensaio teórico em administração e contabilidade. **Administração: Ensino e Pesquisa**, v. 19, n. 2, p. 308-339, 2018.

SOBCZAK, A. I. S.; BLINDAUER, C. A.; STEWART, A. J. Changes in plasma free fatty acids associated with type-2 diabetes. **Nutrients**, v. 11, n. 9, p. 2022, 2019.

TEKULU, G. H.; ARAYA, E. M.; MENGESHA, H. G. In vitro  $\alpha$ -amylase inhibitory effect of TLC isolates of *Aloe megalacantha* baker and *Aloe monticola* Reynolds. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, n. 1, p. 206, 2019.

THOMPSON, G. R. Management of dyslipidaemia. **Heart**, v. 90, n. 8, p. 949-955, 2004.

WONG, H.; SCHOTZ, M. C. The lipase gene family. **Journal of Lipid Research**, v. 43, n. 7, p. 993-999, 2002.

WU, Y.; DING, Y.; TANAKA, Y.; ZHANG, W. Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention. **International Journal of Medical Sciences**, v. 11, n. 11, p. 1185-1200, 2014.

YANAI, H.; YOSHIDA, H. Beneficial effects of adiponectin on glucose and lipid metabolism and atherosclerotic progression: mechanisms and perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5, p. 1190, 2019.

YAO, X.; HUANG, J.; ZHONG, H.; SHEN, N.; FAGGIONI, R.; FUNG, M.; YAO, Y. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers. **Pharmacology & therapeutics**, v. 141, n. 2, p. 125-139, 2014.

ZIELINSKA-BLIZNIEWSKA, H.; SITAREK, P.; MERECZ-SADOWSKA, A.; MALINOWSKA, K.; ZAJDEL, K.; JABLONSKA, M.; SLIWINSKI, T.; ZAJDEL, R. Plant extracts and reactive oxygen species as two counteracting agents with anti- and pro-obesity properties. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 1-30, 2019.

# CAPÍTULO 6

## ESTUDO DE CARBOIDRATOS NA RESINA DE *CROTON URUCURANA* BAILL

Data de aceite: 04/02/2021

**Sabriny Sousa Araujo**

Instituto Federal de Educação, Ciência e  
Tecnologia  
Aparecida de Goiânia, GO  
<http://lattes.cnpq.br/1737629766376163>

**Antônio Zenon Antunes Teixeira**

Instituto Federal de Educação, Ciência e  
Tecnologia  
Aparecida de Goiânia, GO  
<http://lattes.cnpq.br/1299475731142722>

**RESUMO:** *Croton urucurana* Baill é uma planta medicinal amplamente encontrada na região Centro-Oeste. Conhecida popularmente como Sangra-d'água ou Sangue de dragão, pois quando ferida, libera uma seiva resinosa de cor vermelho como sangue. A casca e a resina dessa planta são utilizadas na tradição popular como remédio natural por suas propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas, antissépticas e cicatrizantes. O objetivo deste trabalho é identificar os carboidratos simples (oligossacarídeos e monossacarídeos) da resina in natura do *C. urucurana* por meio da cromatografia em papel. O espécime coletado da planta foi identificado e depositado no herbário da Universidade Federal de Goiás. A separação e identificação de açúcares da resina foram realizadas utilizando cromatografia em papel descendente de 72 horas com fase móvel butanol:etanol:H<sub>2</sub>O (3:2:2) e Benzeno-BuOH-Piridina-H<sub>2</sub>O 1:5:3:3. Em ambas

fases móveis o padrão interno foi a lactose. Os resultados apresentam uma grande quantidade de pentoses e traços de oligossacarídeos. Na fase móvel butanol:etanol:H<sub>2</sub>O (3:2:2), o R<sub>f</sub> de pentoses é 1,5 e os padrões de Manose, Glicose e Galactose apresentaram R<sub>f</sub> de 1,4; 1,2 e 1,1 respectivamente. A fase móvel Benzeno-BuOH-Piridina-H<sub>2</sub>O (1:5:3:3), o R<sub>f</sub> de pentoses é 4,2 e os padrões da xilose e glicose originaram um R<sub>f</sub> de 3,7 e 3,0 respectivamente. A presença de grandes quantidades de pentoses livres podem ser responsável pelo sinergismo em relação as propriedades medicinais apresentadas pela resina.

**PALAVRAS - CHAVE:** *Croton urucurana* Baill, Carboidrato, Cromatografia

### STUDY OF CARBOHYDRATES IN THE RESIN OF *CROTON URUCURANA* BAILL

**ABSTRACT:** *Croton urucurana* Baill is a medicinal plant widely found in the Midwest region. Popularly known as Sangra-d'água or Dragon's Blood, because when wounded, it releases a resinous sap colored red as blood. The bark and resin of this plant are used in popular tradition as a natural remedy for their anti-inflammatory, antibacterial, antiseptic and healing properties. The objective of this work is to identify the simple carbohydrates (oligosaccharides and monosaccharides) of the natural resin of *C. urucurana* by means of paper chromatography. The specimen collected from the plant was identified and deposited in the herbarium of the Federal University of Goiás. The separation and identification of sugars from the resin were performed using chromatography on

72 hour descending paper with mobile phase butanol: ethanol: H<sub>2</sub>O (3: 2: 2) and Benzene-BuOH-Pyridine-H<sub>2</sub>O 1: 5: 3: 3. In both mobile phases, the internal standard was lactose. The results show a large number of pentoses and traces of oligosaccharides. In the mobile phase butanol: ethanol: H<sub>2</sub>O (3: 2: 2), the R<sub>f</sub> of pentoses is 1.5 and the patterns of Mannose, Glucose and Galactose showed R<sub>f</sub> of 1.4; 1.2 and 1.1 respectively. The mobile phase Benzene-BuOH-Pyridine-H<sub>2</sub>O (1: 5: 3: 3), the R<sub>f</sub> of pentoses is 4.2 and the xylose and glucose standards gave an R<sub>f</sub> of 3.7 and 3.0 respectively. The presence of large amounts of free pentoses may be responsible for synergism in relation to the medicinal properties presented by the resin.

**KEYWORDS:** Croton urucurana Baill; Carbohydrate; Chromatography

## INTRODUÇÃO

Archer John Porter Martin e Richard Laurence Millington Synge são reconhecidos por terem inventados a cromatografia em papel que através da simplicidade, elaboração graciosa e execução dos experimentos, que lhes renderão o prêmio Nobel em partição cromatográfica em 1952. Assim, como Paul Ehrlich (prêmio Nobel 1908) fundador da medicina química se utilizava muito da cromatografia em papel em suas análises (HOROWSKI, 2014).

Cromatografia em papel é considerada uma tecnologia obsoleta em frente as novas tecnologias analíticas da atualidade, exceto como uma técnica acessível para ser ensinadas nas escolas e faculdades (WILSON, 2000).

A cromatografia é uma técnica de separação especialmente adequada para ilustrar os conceitos de interações intermoleculares, polaridade e propriedades de funções orgânicas, com uma abordagem ilustrativa e relevante. A cromatografia em papel é uma técnica simples para análise de amostra em pequenas quantidades, aplicada na separação e identificação de compostos polares, tais como açúcares, aminoácidos, pigmentos e íons metálicos (RIBEIRO; NUNES, 2008). A facilidade da técnica torna sua realização acessível em laboratório com recursos materiais mínimos.

A partição dos componentes químicos de uma substância na cromatografia líquido-líquido em papel, compara as distintas solubilidades relativas destes elementos na fase móvel e fase estacionária. Os ingredientes menos solúveis na fase estacionária apresentam uma movimentação mais rápida junto ao papel, por outro lado os mais solúveis na fase estacionária serão retidos conforme sua maior ou menor interação com a fase e por consequência terão uma migração mais lenta. Este funcionamento de partição pode ser entendido dessa forma: a celulose do papel é formada por 2000 unidades ou mais de glicose anidra ligadas por átomos de oxigênio; a água é polar e tem uma grande compatibilidade pelas hidroxilas de cada glicose, formando as pontes de hidrogênio, ficando retido e trabalhando como fase estacionária, e os solventes orgânicos que são menos polares são repelidos por este arcabouço e funcionam como a fase móvel (COLLINS et al., 1997).

Cromatografia em papel é uma técnica acessível e de baixo custo e pode ser de

grande valor nas pesquisas em biotecnologia nos países em desenvolvimento e a busca de novos insumos farmacêuticos sejam eles de origem vegetal ou sintética, é uma das prioridades para qualquer país incluindo o Brasil. Dentre as muitas espécies de plantas que apresentam potencial para novas substâncias químicas é a do gênero *Croton* da família Euphorbiaceae. O *Croton urucurana* Baill é conhecida no Brasil como sangra d'água ou sangue de dragão (LAZLO, 2012), pois quando ferido, libera uma seiva resinosa de cor vermelha como sangue. Tanto a casca como a resina são utilizadas como remédios naturais por suas propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas, antissépticas e cicatrizantes (GURGEL, 2005; LORENZI; MATOS, 2008).

A glicobiologia é o estudo da estrutura, biossíntese e biologia dos sacárideos que são amplamente distribuídos na natureza. Açúcares ou sacárideos são componentes essenciais de todos os seres vivos e aspectos dos vários papéis que desempenham na biologia são pesquisados em vários campos (medicina, bioquímica e biotecnologia). A glicobiologia oferece um enorme potencial inexplorado na descoberta de novas terapias derivadas de sacarídeos ou outras moléculas que visam a biossíntese e função dos sacárideos (GLYCOMAR, 2014).

Sacarídeos têm múltiplas funções que os tornam relevantes para quase qualquer área de pesquisa biológica. Eles estão presentes ubiquamente nas superfícies celulares, mediando a interação entre células com a matriz extracelular e com moléculas efetoras. Os polissacarídeos e os glicoconjugados também desempenham um papel estrutural importante em todos os tecidos conjuntivos. Os oligossacarídeos, que são cadeias curtas (2-10 monossacarídeos) de açúcares derivados de polissacarídeos maiores ou sintetizados por si próprios, são amplamente estudados para identificar grupos funcionais dentro de glicoconjugados ou polissacarídeos complexos.

Atualmente se conhece que certos polissacarídeos atuam como potentes agentes imunomoduladores exibindo atividade biológica e potencial para uso clínico (TZIANABOS, 2000). Estudos com oligossacarídeos sulfatados demonstrou que alguns exibem uma função importante nos processos biológicos ligando-se a proteínas através de interações altamente específicas por exemplo, a heparina como antitrombina, sulfato de heparina como fator de crescimento, tratamento de vírus do herpes simples e através de interações eletrostática entre os grupos sulfatos e os locais catiônicos de proteínas. Os oligossacarídeos sulfatados estão envolvidos em eventos biológicos como a localização de proteínas de células e o controle da proteólise, a modulação da angiogênese e metástases de tumores, assim como a oligomerização de fatores de crescimento celular (KOVENSKY, 2009).

Os oligossacarídeos têm se mostrado valiosos como alimentos e suplementos alimentares; seus efeitos benéficos se estendem a partir de propriedades como antioxidante anti-inflamatório, imunomodulador, antialérgico, hipertenso, hiperlipidêmico e neuro protetor para anticancerígenos (KOTHARI et al.; 2014). A adição na dieta de frangos de corte com arabinoxilooligossacarídeos de farelo de trigo inibiu a colonização de *Salmonella enteridis*

sendo assim o oligossacarídeo estudado apresenta um grande potencial para o controle de salmonelose em frangos de corte (EECKHAUT, 2008).

O papel importante dos oligossacarídeos em áreas terapêuticas como inflamação, imunologia, oncologia, doenças degenerativas, infecção (GLYCOMAR, 2014) e indústria de alimentos (EECKHAUT, 2008); demanda sem precedentes uma investigação mais abrangente e a procura de oligossacarídeos que apresentem estrutura química com atividade médica e uso na indústria de alimentos.

Esse trabalho tem o objetivo de identificar a presença de carboidratos simples na resina da planta *Croton urucurana* Baill por cromatografia em papel.

## MATERIAL E MÉTODOS

Uma amostra da árvore *Croton urucurana* Baill foi coletada no local próximo ao Câmpus do Instituto Federal de Goiás (IFG) de Aparecida de Goiânia. O espécime da planta foi identificada e depositada no herbário da Universidade Federal de Goiás (UFG) com registro N° 50320.

Os solventes orgânicos, padrões de açúcares, papel whatman n° 1 foram obtidos por doações da diferentes campus do IFG e da UFG.

A resina da planta *Croton urucurana* Baill (Figura 1) foi coletada e armazenada. A resina in natura foi analisada por cromatografia em papel Whatman N° 1 utilizando o solvente n-BuOH-EtOH-H<sub>2</sub>O 3:2:2 (TEIXEIRA, 1992), Benzeno-BuOH-Piridina-H<sub>2</sub>O 1:5:3:3 (TEIXEIRA, 1994) para identificação do tempo de retenção dos açúcares livres. As cromatografias foram realizadas a temperatura ambiente e a 2°C. A revelação dos cromatogramas foram realizados com a técnica de nitrato de prato descrita por TREVELYAN (1950).

O fator de retenção (R<sub>f</sub>) foi determinado com base na distância de retenção da lactose como padrão interno e o cálculo é realizado pela distância percorrida pelos demais monossacarídeos divididos pela distância percorrida pela lactose (TEIXEIRA et al., 1992).



Figura 1: Resina da planta *Croton urucurana* Baill.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cromatografia em papel é um método para separar os componentes de uma mistura de soluto por uma extração contínua em contracorrente da solução com um segundo solvente imiscível com o primeiro. Na cromatografia em partição, uma folha de papel do tipo whatman N° 1 serve como suporte para uma fase aquosa imobilizada sobre a qual um solvente orgânico parcialmente miscível é permitido fluir. Uma mistura de soluto introduzida no sistema pode ser separada nos seus componentes desde que possuam coeficientes de partição significativamente diferentes entre a fase móvel e a celulose saturada de água. Quando a partição favorece a fase aquosa, o soluto tenderá a permanecer próximo do ponto de aplicação. Por outro lado, quando a fase orgânica é favorecida, o soluto se moverá com o fluxo de solvente.

Milo et al. (2002) mostraram que o principal componente da goma exsudada da planta medicinal *C. urucurana* isolado por precipitação, subsequente diálise e purificação por cromatografia de permuta iônica é um fucoarabinogalactano. Ela contém 1,0% de proteínas e 93,7% de açúcares totais que constitui principalmente fucose, arabinose e galactose além de pequenas quantidades de manose, xilose, glicose e ácidos urônicos. A composição dos derivados de alditóis acetatos do extrato cru apresentou 17.3% de fucose, 22.1% de arabinose, 2.2% de xilose, 5.7% de manose, 44.0% de galactose, 0.6% de glicose e 6.1% de ácidos urônicos.

O resultado da cromatografia em papel da resina in natura do *C. urucurana* com butanol:etanol:H<sub>2</sub>O (3:2:2) forneceu uma grande quantidade de pentoses e traços de oligossacarídeos (Figura 2). Referindo os resultados do Milo et al. (2002), as pentoses com Rf 1,5 retratam ser uma fucose e arabinose. O oligossacarídeos apresentam o Rf 1,0 semelhante a lactose na qual foi usado como padrão interno. Os padrões de manose, glicose e galactose apresentam um fator de retenção de 1,4; 1,2 e 1,1 respectivamente (Tabela 1).

Enquanto a figura 3 mostra o resultado da cromatografia em papel da resina in natura do *C. urucurana* com benzeno:butanol:piridina:etanol:H<sub>2</sub>O (1:5:3:3). As pentoses com Rf de 4,2 retratam ser uma fucose e arabinose que migrando nas suas respectivas faixa de exclusão. O oligossacarídeo apresentou fator de retenção semelhante a lactose 1,0. Os padrões de xilose e glicose apresentam um fator de retenção de 3,7 e 3,0 respectivamente (Tabela 2).



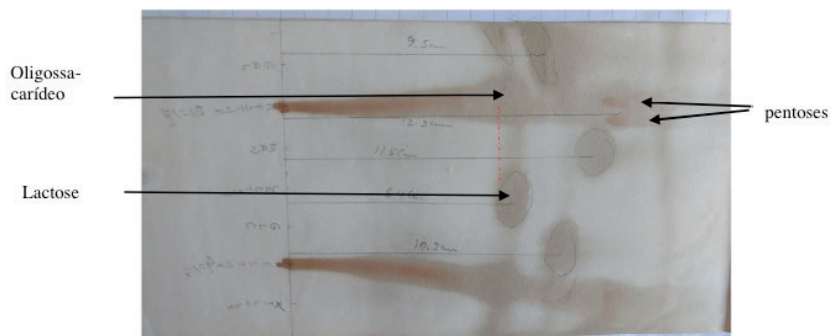


Figura 2: Composição de carboidratos da resina in natura do *C. urucurana* em cromatografia em papel descendente de 72 horas com fase móvel butanol:etanol:H<sub>2</sub>O (3:2:2).

Substância	Distância (cm)	Rf
Pentoses	12,3	1,5
Galactose	9,5	1,1
Manose	11,5	1,4
Lactose	<b>8,4</b>	<b>1,0</b>
Glicose	10,3	1,2

Tabela 1: Fator de retenção de composição de carboidratos de resina do *C. urucurana* em cromatografia em papel descendente de 72 horas com fase móvel butanol:etanol:H<sub>2</sub>O (3:2:2) com lactose como padrão interno

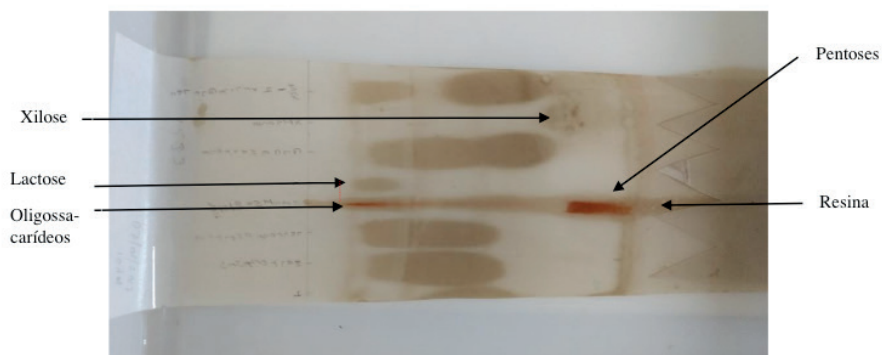


Figura 3: Composição de carboidratos da resina in natura do *C. urucurana* em cromatografia em papel descendente de 72 horas com fase móvel benzeno:butanol:piridina:etanol:H<sub>2</sub>O (1:5:3:3).

Substância	Distância (cm)	Rf
Pentoses	14,3	4,2
Xilose	12,7	3,7
Lactose	<b>3,4</b>	<b>1,0</b>
Glicose	10,3	3,0

Tabela 2: Fator de retenção de composição de carboidratos de resina do *C. urucurana* em cromatografia em papel descendente de 72 horas com fase móvel butanol:piridina:etanol:H<sub>2</sub>O (1:5:3:3) com lactose como padrão interno

A cromatografia em papel é uma técnica analítica muito simples e de fácil execução. Isso quando ela é realizado em salas ambientalizadas com controle de temperatura, umidade e pressão. Com faltas de tais facilidades, foram realizadas várias cromatografias em papel descendentes onde os padrões e amostras migraram juntos. Conhecendo que existem diferentes estruturas químicas de molécula, então, as chances são muito altas de que cada molécula terá pelo menos uma polaridade ligeiramente diferente, dando a cada molécula uma solubilidade diferente no solvente. A solubilidade desigual faz com que as várias moléculas sejam levadas pela fase móvel em diferentes pontos do cromatograma, já que o solvente continua a correr no papel. Quanto mais solúvel é uma molécula, maior será a migração no papel. Se uma estrutura química é muito não polar, não se dissolverá em um solvente muito polar. Isto é o mesmo para uma estrutura química muito polar e um solvente muito não polar.

As amostras e padrões tendem a migrarem em manchas sem resoluções aparentes (Figura 2) e provavelmente fora devido a alta temperatura ambiente e baixa umidade relativa do ar. Tais fatores dificultaram a saturação da celulose por água e tenha ocasionado uma rápida evaporação do etanol e ou butanol quando da utilização da fase móvel n-BuOH-EtOH-H<sub>2</sub>O (3:2:2).

A fase móvel Benzeno-BuOH-Piridina-H<sub>2</sub>O (1:5:3:3) foi utilizada em seguida em razão que ela é uma fase móvel de melhor resolução para monossacarídeos em detrimento dos oligossacarídeos. Porém, o resultado não foi diferente da fase móvel n-BuOH-EtOH-H<sub>2</sub>O (3:2:2). Para controlar a temperatura, realizamos a corrida cromatográfica a 2°C dentro de um refrigerador e consequentemente obtivemos cromatogramas com uma separação dos padrões aceitáveis, mas deixando muito a desejar em matéria de resolução das amostras. Pois, os refrigeradores produzem um certo tipo de vácuo que é difícil de controlar, sem apontar o fator da umidade relativa que é muito baixa dentro de uma geladeira.

O tempo necessário para o desenvolvimento com solventes de butanol é de cerca de 18 horas e em nesse projeto, cromatografias foram padronizadas em 72 horas. Os valores de Rf da maioria dos açúcares são consideravelmente menores nos solventes contendo butanol e por terem uma velocidade lenta são muitas vezes usados para separação de

oligosaccharídeos. No entanto, o butanol em tempo de desenvolvimento muito grande, resulta, que solvente irá escorrer da borda inferior dos papéis. Para obter um padrão de mancha uniforme, é essencial serrar as bordas inferiores dos cromatogramas para que o gotejamento seja uniforme e consequentemente utilizarmos um padrão interno, e nesse caso escolhemos a lactose (TEIXEIRA, 1992). Quando a viagem do açúcar é aumentada pelo desenvolvimento prolongado, muitas vezes é possível separar compostos limpos que possuem  $R_f$  baixos e diferentes. Os dissacarídeos têm valores de  $R_f$  extremamente baixos na mistura de água com etanol-butanol. Assim, é possível fazer separações excepcionalmente largas de glicose, frutose e sacarose, estendendo o tempo de desenvolvimento com este solvente. A fase móvel contendo os solventes orgânicos benzeno e piridina possuem uma velocidade de separação mais lenta e o tempo de corrida pode exceder 72 horas, porém é necessário alimentar a cuba com a fase móvel várias vezes durante o período.

Utilizamos os padrões de xilose, glicose, manose, galactose e lactose. Na Figura 2, a mancha das referidas pentoses em a fase móvel n-BuOH-EtOH-H<sub>2</sub>O (3:2:2) apresentou uma divisão longitudinal e com o mesmo  $R_f$  é 1,5 (Tabela 1). No  $R_f$  igual a 1,0 da lactose obtivemos uma mancha alongada em ambos os cromatogramas (Figura 2 e 3). Com a fase móvel n-BuOH-EtOH-H<sub>2</sub>O (3:2:2), o padrão de galactose mostrou ter um  $R_f$  de 1,1, na qual possibilitar a presença de galactose livre. Na Figura 3, a xilose foi utilizada como padrão na cromatografia com a fase móvel Benzeno-BuOH-Piridina-H<sub>2</sub>O (1:5:3:3). O resultado demonstrou que a resina não identificou a presença de xilose. A mancha no cromatograma atribuída as pentoses apresentou um comportamento alongado na revelação com nitrato de prata (TREVELYAN, 1950) e uma coloração vermelho tijolo indicando monossacarídeos de arabinose e ou fucose.

Nas corridas cromatográficas com a fase móvel Benzeno-BuOH-Piridina-H<sub>2</sub>O (1:5:3:3) não foi possível correr um padrão de galactose por falta do mesmo. Observando a cor vermelho tijolo produzida no centro da mancha somos forçados a concluir que os prováveis oligossacarídeos possuem pentoses em suas composições.

## CONCLUSÃO

Os resultados apresentaram uma quantidade significativa de pentoses e traços de oligossacarídeo. Os fatores como solubilidade nos solventes da fase móvel, temperatura e umidade ambiental influenciaram o desenvolvimento das cromatografias. E o mais importante, as análises em cromatografia em papel da resina in natura serviram o propósito educacional de treinar aluno e se tornou um grande instrumento de aprendizagem de química de carboidratos.

## REFERÊNCIAS

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Introdução a métodos cromatográficos. Editora da UNICAMP, Campinas: São Paulo, 1997.

ECKHAUT, V.; VAN IMMERSEEL, F.; DEWULF, J.; PASMANS, F.; HAESBROUCK, F.; DUCATTELL, R.; COURTIN, C.M.; DELCOUR, J.A. & BROEKAERT, W.F. Arabinoxyloligosaccharides from wheat bran inhibit Salmonella colonization in broiler chickens. *Poultry Science*, v.87, p. 2329–2334, 2008.

GLYCOMAR. *Oligosaccharides in drug Discovery*, 2014. [http://www.glycomar.com/documents/Oligosaccharidesindrugdiscovery\\_2014\\_000.pdf](http://www.glycomar.com/documents/Oligosaccharidesindrugdiscovery_2014_000.pdf) Acesso em: 07 de abril de 2016.

GURGEL, L. A. Estudo das atividades antifúngica, antiinflamatória intestinal e antinocipetiva visceral do látex do *Croton urucurana* Baill. 192 f. *Tese (Doutorado)* Universidade Federal do Ceará. Departamento de Fisiologia e Farmacologia – Fortaleza, 24 Jun, 2005.

HOROWSKI, R. Paul Ehrlich, founder of medicinal chemistry, has used blotting paper for an early form of paper chromatography. *Journal Neural Transmission*, v. 121, p. 27-28, 2014.

KOTHARI, D.; PATEL, S. & GOYAL, A. Therapeutic spectrum of nondigestible oligosaccharides: Overview of current state and prospect. *Journal of Food Science*. v. 79, n. 8. 2014.

KOVENSKY, J. Sulfated oligosaccharides: New targets for drug development? *Current Medicinal Chemistry*, v. 16, p. 2338–2344, 2009.

LASZLO, F. Sangue de Dragão: O sangue cicatrizante da floresta, 2012. <[http://laszlo.ind.br/campanhas/sangue\\_de\\_dragao\\_laszlo.pdf](http://laszlo.ind.br/campanhas/sangue_de_dragao_laszlo.pdf)> Acesso em: 07 de abril de 2016.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. São Paulo: Instituto Plantarum, ed. 2a, 2008, 544p.

MILO, B.; RISCO, E.; VILA, R.; IGLESIAS, J. & CAÑIGUERAL, S. Characterization of a fucoarabinogalactan the main polysaccharide from the gum exudate of *Croton urucurana*. *Journal Natural Product*, v. 65 p. 1143–1146. 2002.

RIBEIRO, N.M.; NUNES, C.R. Análise de pigmentos de pimentões por cromatografia em papel. *Química Nova na Escola*, n.29, 2008.

TEIXEIRA, A.Z.A.T.; IACOMINI, M. & GORIN, P.A.J. An unusual glucomannan from *Tornabenia intricata*. *Phytochemistry*, v.31, n. 10, p. 3467–3470, 1992.

TEIXEIRA, A.Z.A.; IACOMINI, M.; MCCUNE, B. & GORIN, P.A.J. Heteropolysaccharide of the lichen *Evernia prunastri*. *Carbohydrate Research*, v. 264 p. 63–71, 1994.

TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P. & HARRISON, J.S. Detection of sugars on paper Chromatograms. *Nature*, v. 166, p. 444–445, 1950.

TZIANABOS, A.O. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 13, n.4 Oct., p. 523–533, 2000.

WILSON, I.D. Paper chromatography. Chromatography, AstraZeneca Pharmaceuticals, Cheshire, UK. p. 397-404, 2000.

# CAPÍTULO 7

## IMOBILIZAÇÃO DA TANASE DE *ASPERGILLUS OCHRACEUS* E APLICAÇÃO NA SÍNTESE DE PROPIL GALATO ANALISADA POR ESPECTROMETRIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Data de aceite: 04/02/2021

Data de submissão: 07/12/2020

### Rayza Morganna Farias Cavalcanti

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Química - Campus de Araraquara – UNESP  
Araraquara – SP

CV: <http://lattes.cnpq.br/6718131576693229>

### Chadia Chahud Maestrello

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Química - Campus de Araraquara – UNESP  
Araraquara – SP

CV: <http://lattes.cnpq.br/0544094782013333>

### Luís Henrique Souza Guimarães

Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP/FFCLRP  
Ribeirão Preto – SP

CV: <http://lattes.cnpq.br/1197732179850477>

**RESUMO:** A tanino acil hidrolase (TAH; EC 3.1.1.20), conhecida popularmente como tanase, catalisa a hidrólise de ligações éster e depsídicas de taninos complexos e hidrolisáveis, liberando ácido gálico e glicose (galotaninos), ou ácido elágico e glicose (elagitaninos). A aplicação mais importante desta enzima é na produção de ácido gálico, utilizado como agente intermediário na síntese de propil galato (PG). O PG é usualmente empregado nas indústrias de alimentos, cosméticos e farmacêutica devido sua atividade

antioxidante. Portanto, o presente estudo objetivou a imobilização da tanase de *Aspergillus ochraceus*, caracterização do derivado obtido e aplicação na síntese de PG. A imobilização em alginato reticulado com  $MnCl_2$  apresentou maior rendimento (100%), eficiência (100%) e atividade enzimática recuperada (74%). A tanase imobilizada em Mn-alginato exibiu maior atividade a 50 °C e pH 5,0 e, após 10 ciclos de reutilização do derivado, 57% da atividade enzimática foi preservada. Adicionalmente, apresentou maior estabilidade térmica a 40 - 60 °C e aos pH 4,0 - 7,0 após 6 h de incubação quando comparada a forma livre. As análises em TLC mostraram a efetividade do derivado contendo tanase para sintetizar PG, sendo confirmada pelos espectros de FTIR, com picos nas regiões 2960 e 2850  $cm^{-1}$  e próximo a 1650  $cm^{-1}$ , característicos da molécula de PG. Deste modo, o derivado contendo a tanase de *A. ochraceus* apresenta potencial para aplicação industrial na síntese de propil galato, oferecendo vantagens pela possibilidade de sua reutilização em diferentes ciclos catalíticos.

**PALAVRAS - CHAVE:** Alginato, Imobilização, Propil Galato, Tanino acil hidrolase.

### IMMOBILIZATION OF THE TANNASE OF *ASPERGILLUS OCHRACEUS* AND APPLICATION IN THE SYNTHESIS OF PROPIL GALATO ANALYZED BY INFRARED SPECTROMETRY WITH FOURIER TRANSFORMED (FT-IR)

**ABSTRACT:** Tannyn acyl hydrolase (TAH; EC 3.1.1.20), popularly known as tannase, catalyzes the hydrolysis of ester and depsidic bonds of complex and hydrolyzable tannins, releasing

gallic acid and glucose (gallotannins), or ellagic acid and glucose (ellagitannins). The most important application of this enzyme is in the production of gallic acid, used as an intermediate agent in the synthesis of propyl gallate (PG). PG is usually used in the food, cosmetics and pharmaceutical industries due to its antioxidant activity. Therefore, the present study aimed to immobilize *Aspergillus ochraceus* tannase, characterization the derivative and its application in the PG synthesis. Immobilization in  $\text{MnCl}_2$  crosslinked alginate showed higher yield (100%), efficiency (100%) and recovered enzymatic activity (74%). The immobilized tannase on Mn-alginate showed best activity at 50 °C and pH 5.0 and, after 10 cycles of reuse of the derivative, 57% enzymatic activity was preserved. Additionally, it was stable at 40 - 60 °C and at pH 4.0-7.0 after 6 hours of incubation when compared to free enzyme. The TLC analyzes showed the effectiveness of the derivative containing tannase to synthesize PG, confirmed by the FT-IR spectra, with peaks at 2960 and 2850  $\text{cm}^{-1}$  and close to 1650  $\text{cm}^{-1}$  characteristic of the PG molecule. Thus, the derivative containing tannase from *A. ochraceus* has potential for industrial application for the synthesis of propyl gallate, offering advantages due to the possibility of its reuse in different catalytic cycles.

**KEYWORDS:** Alginate, Immobilization, Propyl Gallate, Tannin acyl hydrolase.

## 1 | INTRODUÇÃO

A enzima tanino acil hidrolase (TAH; EC 3.1.1.20), comumente denominada de tanase, catalisa a hidrólise de ésteres e ligações depsídicas de taninos complexos e hidrolisáveis, como o ácido tânico, liberando glicose e ácido gálico no caso dos galotaninos, e ácido elágico na hidrólise de elagitaninos (GONZÁLEZ et al., 2016; DHIMAN et al., 2017). Estas enzimas podem ser obtidas de fonte vegetal, animal e microbiana (bactérias, leveduras e fungos filamentosos). Contudo, a maioria das tanases disponíveis comercialmente são produzidas por espécies de *Aspergillus* cultivadas em Fermentação Submersa (FSbm) (KHUMAR et al., 2018). Potencialmente aplicadas em diversos setores industriais, as tanases podem ser empregadas na indústria de bebidas como, por exemplo, no processamento de chás instantâneos, como agente clarificador de sucos de frutas e em bebidas geladas a base de café, sendo responsável pela remoção de compostos fenólicos (DHIMAN et al., 2017). A aplicação mais importante das tanases é na produção de ácido gálico, o qual apresenta atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, antitumoral e antidiabética (CHOUBEY et al., 2018).

O ácido gálico (AG) é o agente intermediário na síntese de propil galato (3,4,5-tri-hidroxibenzoato de n-propila) (PG), um antioxidante utilizado como aditivo na indústria de alimentos, em cosméticos, produtos farmacêuticos, embalagens de alimentos e lubrificantes (ZHANG et al., 2014). O PG é produzido em escala industrial pela reação de condensação do AG com ácido sulfúrico em altas temperaturas e condições fortemente ácidas, o que acarreta a geração de poluentes (ZHANG et al., 2014). Por via enzimática, pode ser sintetizado a partir do AG e n-propanol por reação de esterificação ou transesterificação entre o ácido tânico e n-propanol (SHARMA et al., 2017).

O emprego das tanases em processos industriais pode ser realizado com a enzima solúvel ou imobilizada. A imobilização enzimática proporciona vantagens como reutilização do derivado (enzima imobilizada no suporte) por repetidos ciclos de reação, facilidade no manuseio e da separação do produto, e melhoria da estabilidade enzimática (ONG; ANNUAR, 2018). Há vários métodos para imobilização empregando diferentes suportes e fatores como custo, toxicidade dos reagentes e as propriedades desejadas do derivado devem ser considerados (JANA et al., 2015).

Portanto, devido ao potencial de aplicação das tanases na síntese de propil galato e as vantagens de utilizar enzimas imobilizadas em processos industriais, este trabalho teve como objetivo a imobilização da tanase de *Aspergillus ochraceus*, caracterização do derivado e aplicação na síntese de propil galato.

## 2 | METODOLOGIA

### 2.1 Produção de tanase por *A. ochraceus*

O fungo filamentoso *A. ochraceus*, previamente caracterizado como produtor de tanase (GONÇALVES et al., 2012), está depositado na micoteca do Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Novas culturas de *A. ochraceus* foram obtidas em meio BDA (batata, dextrose e ágar) inclinado após incubação por 168 h a 30 °C, e posteriormente, conservadas a 4 °C.

Para produção de tanase, 1 mL de uma suspensão de esporos de *A. ochraceus* na concentração de  $10^5$  (esporos/mL) foi inoculada em 25 mL de meio de cultura Khanna (KHANNA; SUNDARIL; KUMAR, 1995), acrescido de 2% (m/v) de ácido tânico como fonte de carbono. O meio de cultura foi previamente autoclavado a 120 °C por 20 min e o ácido tânico esterilizado separadamente por microfiltração (0,22 µm). Os cultivos foram conduzidos sob agitação orbital (100 rpm) por 72 h, a 30 °C (GONÇALVES et al., 2012).

### 2.2 Obtenção do filtrado extracelular e purificação da tanase

Para obtenção da tanase extracelular, após o período de incubação, os cultivos foram filtrados a vácuo em funil Büchner, com papel de filtro Whatman nº 1, obtendo-se o caldo de cultura livre de células, denominado de filtrado extracelular. O filtrado foi dialisado contra 4 L de água destilada por 24 h a 4 °C e, em seguida, aplicado em membrana Millipore com *cutoff* de 50 kDa, submetido a centrifugação a 2800 x *g* a 4 °C por 15 min. A enzima retida no permeado foi empregada para imobilização enzimática.

## 2.3 Imobilização enzimática em alginato de sódio reticulado com $\text{CaCl}_2$ e $\text{MnCl}_2$

A solução de alginato de sódio 4% (m/v) foi preparada em água destilada e agitada por 4 h a 28 °C. Em seguida, a solução foi misturada com a amostra enzimática, obtendo-se uma concentração final de 3% de alginato, e suavemente agitada por 15 min a 4 °C. A suspensão foi gotejada, com auxílio de uma seringa, na solução  $\text{CaCl}_2$  (0,1 mol L<sup>-1</sup>), e as esferas formadas foram mantidas em agitação suave na solução  $\text{CaCl}_2$  por 20 min a 4 °C. Em seguida, foram separadas por peneiramento e lavadas com tampão acetato de sódio (100 mmol L<sup>-1</sup> pH 5,0). O mesmo procedimento foi realizado substituindo  $\text{CaCl}_2$  (Ca-alginato) por  $\text{MnCl}_2$  (0,1 mol L<sup>-1</sup>) (Mn-alginato). As esferas foram armazenadas em tampão acetato de sódio (100 mmol L<sup>-1</sup> pH 5,0) a 4 °C. O processo de imobilização foi monitorado por meio da atividade enzimática e quantificação de proteínas no sobrenadante.

## 2.4 Determinação da atividade enzimática

A atividade tanásica foi determinada pelo método da rodanina metanólica (SHARMA; BHAT; DAWRA, 2000), utilizando metil galato (0,2% m/v) como substrato em tampão acetato de sódio 100 mmol L<sup>-1</sup> (pH 5,0). O método foi previamente padronizado por uma curva analítica de ácido gálico (0 a 0,1 mg mL<sup>-1</sup>). Para tanase imobilizada, a reação foi composta por 2 mL de substrato adicionados de 1 g do derivado. Após 5 min de reação, alíquotas de 500 µL foram transferidas para tubos reacionais e 300 µL de rodanina metanólica 0,667% (m/v) foram adicionados. Após 5 min, pipetou-se 200 µL de hidróxido de potássio (0,5 mol L<sup>-1</sup>) para formação de um cromatógeno de coloração violeta. O volume obtido foi adicionado de 4 mL de água destilada. Após 10 min foi realizada a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 520 nm. A unidade de atividade tanásica (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de ácido gálico por minuto nas condições de ensaio.

## 2.5 Quantificação de proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão (0-01 mg mL<sup>-1</sup>).

## 2.6 Determinação do rendimento, eficiência e atividade recuperada

O rendimento da imobilização (R%) foi calculado pela relação entre a atividade inicialmente oferecida e a atividade enzimática do sobrenadante após imobilização, de acordo com a Equação 1:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Atividade tanase livre} - \text{Atividade do sobrenadante}}{\text{Atividade tanase livre}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

A eficiência do processo de imobilização foi calculada por meio da quantificação de proteínas do sobrenadante após o processo de imobilização e da concentração de proteínas oferecida (Equação 2).



$$PI (\%) = \frac{Proteína_{inicial} - Proteína_{sobrenadante}}{Proteína_{inicial}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

A atividade recuperada foi calculada considerando a atividade enzimática dos derivados (CARAVANTE, 2014) de acordo a Equação 3:

$$Atividade\ recuperada = \frac{Atividade\ do\ derivado}{U_{esperado}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Em que:  $U_{esperado}$  foi determinado conforme Equação 4, considerando o rendimento (R) na escala de 0-1.

$$U_{esperado} = \frac{Atividade\ da\ enzima\ livre \times Volume\ da\ enzima\ usado\ na\ imobilização}{Massa\ do\ derivado} \times R \quad \text{Equação 4}$$

## 2.7 Efeito da temperatura na atividade enzimática e estabilidade térmica

O efeito da temperatura na atividade enzimática da tanase livre e imobilizada foi determinado conduzindo as reações enzimáticas nas temperaturas de 30 °C a 80 °C. A maior atividade foi considerada como 100% e usada como referência. A estabilidade térmica foi verificada incubando a tanase livre e imobilizada a 30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C por um período de 6 h. A cada intervalo de tempo alíquotas foram retiradas, mantidas em banho de gelo e, em seguida, ensaiadas para atividade tanásica. A atividade enzimática no tempo 0 foi considerada como 100%.

## 2.8 Efeito do pH na atividade tanásica e estabilidade ao pH

O efeito do pH na atividade enzimática da tanase livre e imobilizada foi determinado utilizando tampão ácido cítrico 100 mmol L<sup>-1</sup> (pH 3,0 e 4,0), tampão acetato de sódio 100 mmol L<sup>-1</sup> (pH 5,0 e 6,0), tampão Tris-HCl 100 mmol L<sup>-1</sup> (pH 7,0) e glicina 100 mmol L<sup>-1</sup> (pH 8,0). A maior atividade foi considerada 100% e usada como referência. A estabilidade ao pH foi realizada incubando a tanase livre e imobilizada nas soluções tampão citadas acima, no pH 4,0 a 7,0, e mantidas em banho de gelo. Alíquotas foram retiradas em diferentes intervalos de tempo e a atividade enzimática foi determinada. A atividade enzimática no tempo 0 foi considerada como 100%.

## 2.9 Reutilização do derivado

A reação enzimática foi conduzida utilizando o derivado Mn-alginato e 0,2% (m/v) de metil galato como substrato por 5 min nas condições ótimas de temperatura e pH por diferentes ciclos consecutivos. Após cada ciclo, o derivado foi recuperado por peneiramento, lavado com tampão acetato de sódio (10 mmol L<sup>-1</sup> pH 5,0) e utilizado no ciclo seguinte. A atividade enzimática do 1º ciclo foi definida como 100%.

## 2.10 Síntese de propil galato (PG)

O derivado foi aplicado na síntese de PG a partir da transesterificação do ácido tânico na presença de 1-propanol. A reação foi composta por 500  $\mu\text{L}$  de ácido tânico (5  $\text{mmol L}^{-1}$  preparado em tampão MES 100  $\text{mmol L}^{-1}$  pH 6,0), 500  $\mu\text{L}$  de 1-propanol e 15 esferas de tanase imobilizada. A mistura de reação foi mantida a 30 °C por 48 - 96 h. Em seguida, as esferas foram recuperadas por peneiramento e o sobrenadante utilizado para detectar a presença de PG por cromatografia de camada delgada (TLC) e Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).

### 2.10.1 Análise por TLC

Para analisar qualitativamente a hidrólise do ácido tânico em ácido gálico e a síntese de propil galato, as amostras foram aplicadas em TLC, seguindo metodologia descrita por Mahendran e colaboradores (2006). Como fase móvel foi utilizada solução de benzeno: acetato de etila: ácido fórmico (18:15:1, v/v/v). Após a corrida, o ácido tânico residual, o propil galato e o ácido gálico formados foram revelados com  $\text{FeCl}_3$  1% (m/v). Como padrões foram utilizados ácido tânico (AT) (1  $\text{mmol L}^{-1}$ ), ácido gálico (AG) (10  $\text{mmol L}^{-1}$ ) e propil galato (10  $\text{mmol L}^{-1}$ ) preparados em tampão MES (100  $\text{mmol L}^{-1}$  pH 6,0).

### 2.10.2 Análise por FTIR

Amostras das reações de transesterificação foram analisadas por FTIR, usando espectrômetro infravermelho Bruker Vertex 70 com reflexo total atenuado (ATR), para determinar as estruturas presentes. O software utilizado foi o OPUS 7.5, resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , tempo de varredura de 64 varreduras e comprimento de onda de 4000  $\text{cm}^{-1}$  a 400  $\text{cm}^{-1}$ . O propil galato (Sigma®) foi utilizado como padrão. As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Análises Químicas do Instituto de Química de Araraquara (UNESP).

### 2.10.3 Análise dos experimentos

Os ensaios foram realizados em triplicata e analisados com base na média e no erro padrão. Para análise dos dados e representações gráficas foram utilizados os programas Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft®) e OriginPro 8 (OriginLab® Corporation - *Trial version*).

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Imobilização da tanase produzida por *Aspergillus ochraceus*

Os resultados da imobilização da tanase produzida por *A. ochraceus* estão apresentados na Tabela 1. Os maiores índices de rendimento (100%), eficiência (100%) e atividade recuperada (73,84%) foram obtidos no suporte Mn-alginato. A atividade reduzida no derivado Ca-alginato pode ser explicada pela influência negativa que o  $\text{CaCl}_2$  exerce na atividade da tanase de *A. ochraceus*, levando a uma redução de 27% da atividade catalítica, enquanto que na presença de  $\text{MnCl}_2$  foi observado aumento de 33%, como descrito por Gonçalves et al. (2012). A imobilização em alginato reticulado com  $\text{CaCl}_2$  foi relatada para tanase de *Paecilomyces variotii* (ROBERTO et al., 2016), *A. ficcum* (LIMA et al., 2018) e *Penicillium rolsii* CCMB 714 (ANDRADE et al., 2020). O uso de  $\text{MnCl}_2$  como agente reticulante na imobilização foi relatado para enzima D-hidantoinase (JIN et al., 2016). Contudo, até o presente momento, não há relatos de uso para imobilização de tanase.

Métodos	Rendimento (%)	Eficiência (%)	Atividade recuperada (%)
Ca-Alginato	100 ± 0	92,97 ± 2,75	32,26 ± 3,76
Mn-Alginato	100 ± 0	100 ± 0	73,84 ± 11,15

Tabela 1. Imobilização da tanase de *A. ochraceus* em alginato de sódio.

O derivado Mn-alginato foi caracterizado quanto ao perfil de atividade enzimática em diferentes temperaturas e valores de pH, e ciclos de reutilização. Na Figura 1, observa-se que o derivado contendo tanase exibiu maior atividade a 50 °C, enquanto que a enzima livre a 60 °C. Com relação ao pH, o derivado Mn-alginato exibiu máxima atividade em pH 5,0 e a enzima livre no pH 6,0. Em valores de pH inferiores e superiores aos observados como melhores, a atividade enzimática foi reduzida. O tipo de suporte e o método de imobilização podem exercer influência nas propriedades bioquímicas das enzimas imobilizadas. Kumar et al. (2015) observaram que a tanase de *A. awamori* imobilizada em Amberlite apresentou temperatura (55 °C) e pH (4,0) diferentes da sua forma livre (30 °C e pH 5,5). Li et al. (2018) descreveram que a imobilização da tanase em nanopartículas magnéticas não afetou a temperatura de reação, no entanto o pH foi deslocado para faixa mais ácida (4,5).

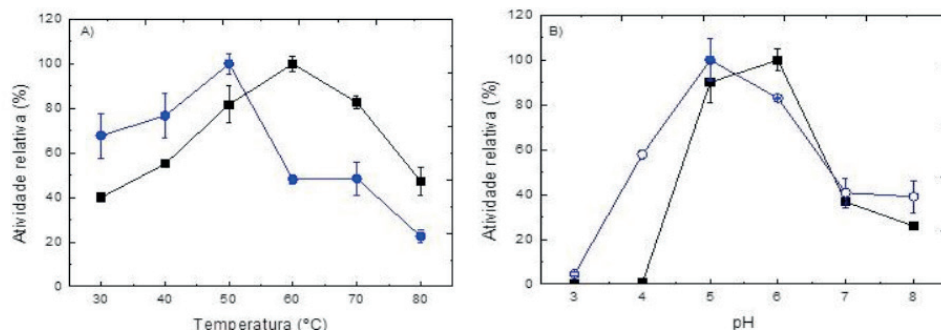


Figura 1. Efeito da temperatura (A) e pH (B) na atividade enzimática da tanase de *A. ochraceus* livre (■) e imobilizada em Mn-alginato (●).

A Figura 2 apresenta a atividade tanásica do derivado Mn-alginato por 10 ciclos consecutivos. Após o 6º ciclo catalítico, o derivado preservou 95% de sua atividade inicial, e ao longo do 10º ciclo manteve cerca de 57% de atividade. Destaca-se também que não foram observadas mudanças visuais no suporte ao longo dos 10 ciclos de reutilização. Os resultados descritos foram superiores aos encontrados para tanase de *A. ficcum* imobilizada em alginato, que reteve apenas 35% da atividade no 9º ciclo (LIMA et al., 2018), e de *P. rolfsii* CCMB 714 (ANDRADE et al., 2020), com retenção de 50% ao longo de 6 ciclos.

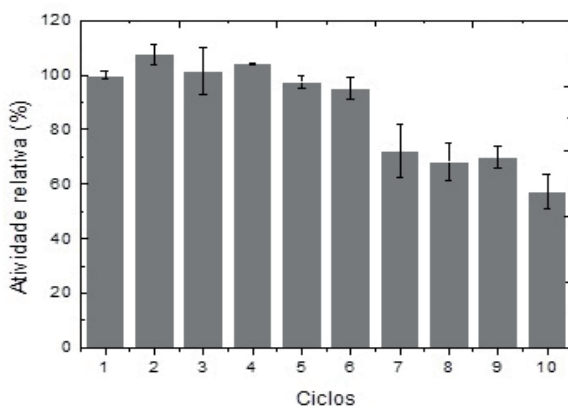


Figura 2. Ciclos de reutilização da tanase de *A. ochraceus* imobilizada em Mn-alginato.

Os perfis de estabilidade térmica da tanase livre e do derivado Mn-alginato após incubação em diferentes temperaturas são apresentados na Figura 3. Verifica-se que a enzima livre se manteve estável a 30 °C após 6 h de incubação e nas temperaturas de 40 °C e 50 °C permaneceu com cerca de 65% da atividade inicial. Destaca-se que a 60 °C a tanase livre teve 50% de sua atividade reduzida quando incubada por 30 min.

Diferentemente do observado para a forma livre, o derivado Mn-alginato permaneceu estável de 30 - 50 °C por 6 h. Quando incubado a 60 °C, 75% da atividade tanásica foi preservada por até 4 h de incubação. Os perfis de estabilidade sugerem que a imobilização em Mn-alginato possibilitou o aumento da resistência térmica da tanase de *A. ochraceus*. Resultados semelhantes foram observados por Lima et al. (2018) para a tanase de *A. ficuum* imobilizada em Ca-alginato. Os autores destacaram que a enzima imobilizada apresentou estabilidade a 60 °C, superior a enzima livre, após 120 min de incubação. Andrade et al. (2020) relataram que a enzima de *P. rolfsii* CCMB 714 imobilizada em esferas de alginato manteve 80% de atividade após incubação por 16 h a 40 °C e 50 °C, exibindo maior estabilidade do que a tanase livre.

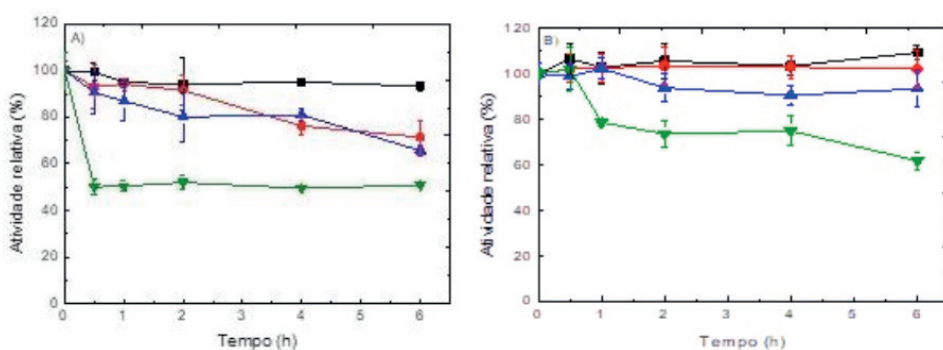


Figura 3. Estabilidade térmica a 30 °C (■), 40 °C (●), 50 °C (▲) e 60 °C (▼) da tanase de *A. ochraceus* livre (A) e imobilizada em Mn-alginato (B).

Na estabilidade ao pH (Figura 4), cerca de 80% da atividade da tanase livre foi mantida quando incubada no pH 5,0 e 6,0 por 6 h. No pH 4,0 e 7,0 a atividade foi reduzida cerca de 50% após 2 h de incubação. Assim como observado para estabilidade térmica, a imobilização conferiu maior resistência às mudanças de pH. O derivado Mn-alginato exibiu estabilidade superior em diferentes valores de pH por longos períodos de incubação, preservando totalmente a atividade tanásica quando mantido em pH 4,0 - 7,0 por 6 h de incubação. Na forma imobilizada, a mobilidade conformacional da enzima é limitada o que reduz a inativação por fatores externos, como temperatura e pH (ONG; ANNUAR, 2018). Wu et al. (2016) verificaram maior estabilidade térmica e ao pH da tanase de *A. tubingensis* imobilizada em nanopartículas magnetizadas. Kumar et al. (2015) descreveram melhora na estabilidade térmica e ao pH (3,5-6,0) da tanase de *A. awamori* imobilizada em Amberlite quando comparada a enzima livre.

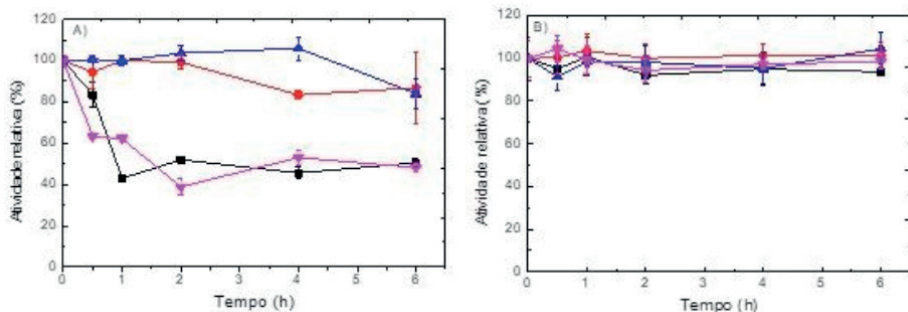


Figura 4. Estabilidade ao pH 4,0 (■), 5,0 (●), 6,0 (▲) e 7,0 (▼) da tanase de *A. ochraceus* livre (A) e imobilizada em Mn-alginato (B).

### 3.2 Aplicação do derivado Mn-alginato na síntese de propil galato

A Figura 5 apresenta o perfil cromatográfico em TLC para os produtos da reação de transesterificação do ácido tânico pela ação da tanase na presença de 1-propanol. O derivado Mn-alginato catalizou a síntese de propil galato em meio orgânico a partir da hidrólise do ácido tânico e, posteriormente, esterificação do ácido gálico. A medida que a reação foi conduzida por períodos mais longos, houve intensificação da banda correspondente ao propil galato (tempo de 96 h).

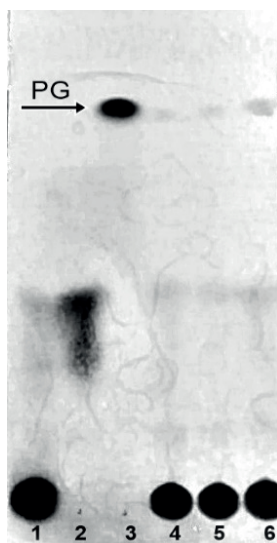


Figura 5. Perfil cromatográfico em TLC dos produtos obtidos a partir da reação de transesterificação do ácido tânico (raia 1) na presença de 1-propanol pelo derivado Mn-alginato contendo tanase de *A. ochraceus*. Raias: (2) AG; (3) PG; (4) reação de 48 h; (5) 72 h; (6) 96 h.

Os espectros em FTIR das amostras das reações enzimáticas comprovam a

produção de propil galato pelo derivado Mn-alginato, uma vez que o perfil dos picos obtidos foi semelhante ao obtido para o propil galato comercial utilizado como padrão (Figura 6). Os picos entre  $2960\text{ cm}^{-1}$  e  $2850\text{ cm}^{-1}$  indicam a presença do grupo  $\text{CO}_2$ , enquanto picos próximos a  $1650\text{ cm}^{-1}$  correspondem aos grupos éster carbonílicos, ambos característicos da molécula de propil galato. Trechos próximo a  $1100\text{ cm}^{-1}$  foram observados e correspondem à vibração (C–O–C), também característico do PG. Os espectros obtidos para o propil galato (controle) e para as amostras das reações conduzidas por 48 h, 72 h e 96 h apresentaram picos semelhantes entre si e similares aos relatados para o PG produzido pela tanase livre de *A. awamori* BTMFW032 (BEENA et al., 2011), de *A. ochraceus* (ARACRI; CAVALCANTI; GUIMARÃES, 2019) e pela ação da tanase de *A. fumigatus* CAS21 seca em *spray dryer* (CAVALCANTI et al., 2020).

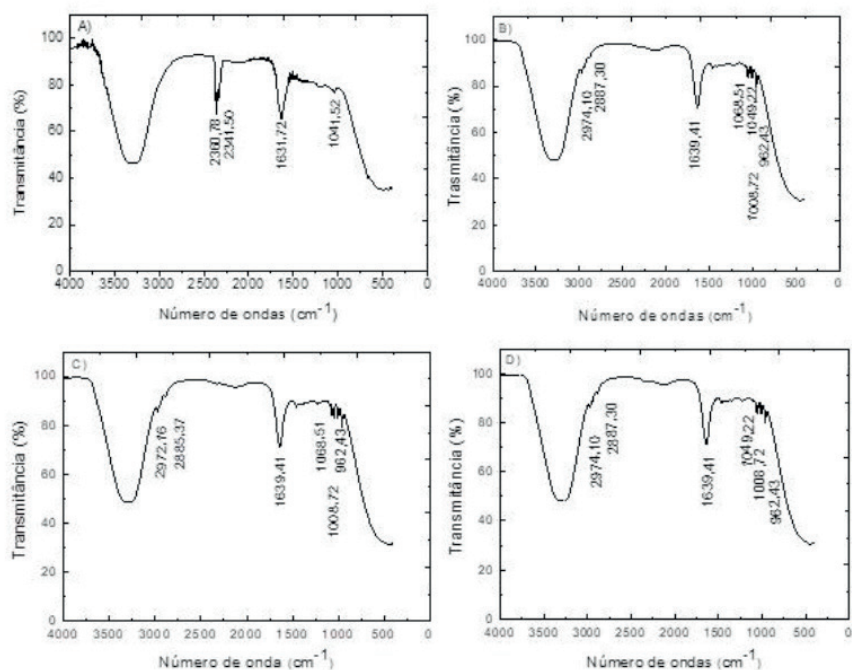


Figura 6. Espectros de FTIR do propil galato comercial (A) e sintetizado pela ação do derivado Mn-alginato contendo a tanase de *A. ochraceus* para as reações conduzidas por 48 h (B), 72 h (C) e 96 h (D).

## 4 | CONCLUSÃO

A imobilização da tanase de *A. ochraceus* no suporte Mn-alginato permitiu maximizar a resistência da enzima a diferentes temperaturas e valores de pH, além de possibilitar a reutilização do derivado por ciclos consecutivos. O derivado foi capaz de sintetizar propil

galato em meio orgânico a partir da transesterificação do ácido tânico. Portanto, o derivado Mn-alginato contendo tanase de *A. ochraceus* apresenta potencial para aplicação nas indústrias alimentícias, de cosméticos e farmacêuticas.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, P. M. L. et al. Immobilization and characterization of tannase from *Penicillium rolfsii* CCMB 714 and its efficiency in apple juice clarification. **Journal of Food Measurement and Characterization**. 2020. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00705-9>

ARACRI, F. M.; CAVALCANTI, R. M. F.; GUIMARÃES, L. H. S. *Aspergillus ochraceus* biofilm fermentation as alternative for the production of an extracellular tannase with biotechnological potential. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 28;29 (11), p. 1749-1759, 2019. <https://doi.org/10.4014/jmb.1903.03060>

BEENA, P. S. et al. Propyl gallate synthesis using acidophilic tannase and simultaneous production of tannase and gallic acid by marine *Aspergillus awamori* BTMFW032. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 164, 612-628, 2011.

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

CARAVANTE, A. L. C. **Uso de invertase imobilizada em pó de sabugo de milho para produção de açúcar invertido**. 2014. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). UNESP, Araraquara, 88 f.

CAVALCANTI, R. M. F.; MARTINEZ, M. L. L.; OLIVEIRA, W. P.; GUIMARÃES, L. H. S. Stabilization and application of spray-dried tannase from *Aspergillus fumigatus* CAS21 in the presence of different carriers. **3 Biotech**, v. 10, 2020. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2164-z>

CHOUBEY, S. et al. Probing gallic acid for its broad spectrum applications. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 1283-1293, 2018.

DHIMAN, S. et al. Fungal tannase: Recent advances and Industrial applications. *In: Developments in fungal biology and applied mycology*. Satyanarayana, T et al. (eds.) 2017. Springer Nature Singapore, Cap. 16, p. 295-313.

GONÇALVES, H. B. et al. Characterization of a thermostable extracellular tannase produced under submerged fermentation by *Aspergillus ochraceus*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 5, p. 4, 2012.

GONZÁLEZ, M. L. C. et al. Tannases. *In: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. PANDEY, A.; NEGI, S. SOCCOL, C. R. (eds.) 2016. Elsevier, Cap. 20, p. 471- 489.

JANA, A. et al. Tannase immobilization by chitin-alginate based adsorption-entrapment technique and its exploitation in fruit juice clarification. **Food Bioprocess Technology**, v. 8, p. 2319–2329, 2015.

JIN, Y. Y. et al. Thewhole-cell immobilization of D-hydantoinase-engineered *Escherichia coli* for D-CpHPG biosynthesis. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 43-48, 2016

KHANNA, P.; SUNDARIL, S. S.; KUMAR, N. J. Production, isolation and partial purification of xylanases



from *Aspergillus* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 242-243, 1995.

KUMAR, S. S.; SREEKUMAR, R.; SABU, A. Tannase and its applications in food processing. In: PARAMESWARAN, B.; VARJANI, S.; RAVEENDRAN, S. (eds) **Green Bio-processes. Energy, Environment, and Sustainability**. Springer, Singapore, 2018. Cap. 19, p. 357-381.

KUMAR, S. et al. Biochemical characterization of immobilized tannase from *Aspergillus awamori*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 398-403, 2015.

LI, R. et al. Tannase immobilisation by amino-functionalised magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- chitosan nanoparticles and its application in tea infusion. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 1134–1143, 2018.

LIMA, J. S. et al. Immobilization of *Aspergillus ficuum* tannase in calcium alginate beads and its application in the treatment of boldo (*Peumus boldus*) tea. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018.

MAHENDRAN, B.; RAMAN, N.; KIM, D. Purification and characterization of tannase from *Paecilomyces variotii*: hydrolysis of tannic acid using immobilized tannase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 445-451, 2006.

ONG, C. B.; ANNUAR, M. S. M. Immobilization of cross-linked tannase enzyme on multiwalled carbon nanotubes and its catalytic behavior. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 48, n. 2, p. 181-187, 2018.

ROBERTO, B. S. et al. Immobilized tannase treatment alters polyphenolic composition in teas and their potential anti-obesity and hypoglycemic activities *in vitro*. **Food & Function**, v. 14, n. 7 (9), 2016.

SHARMA, A. et al. Fabrication and functionalization of magnesium nanoparticle for lipase immobilization in n-propyl gallate synthesis. **Journal of King Saud University – Science**, v. 29, p. 536-546, 2017.

SHARMA, S.; BHAT, T. K.; DAWRA, R. K. A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine. **Analytical Biochemistry**, v. 279, p. 85-89, 2000.

WU, C. et al. Preparation and characterization of tannase immobilized onto carboxyl functionalized superparamagnetic ferroferric oxide nanoparticles. **Bioresource Technology**, v. 205, p. 67-74, 2016.

ZHANG, S. et al. Novel trends for use of microbial tannases. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 45, n. 3, p. 221-232, 2014. <https://doi.org/10.1080/10826068.2014.907182>

# CAPÍTULO 8

## SOFTWARES PARA GERENCIAMENTO LABORATORIAL: O USO DA TECNOLOGIA A FAVOR DA CIÊNCIA E DA COMUNIDADE

*Data de aceite: 04/02/2021*

**Kely Cristina Mendonça Couto**

Universidade José do Rosário Vellano  
Divinópolis-MG  
<http://lattes.cnpq.br/2414630326422120>

**Tayara Nataly Lopes Silva**

Universidade José do Rosário Vellano  
Divinópolis-MG  
<http://lattes.cnpq.br/1219240415150713>

**RESUMO:** O bom funcionamento de um laboratório de análises clínicas exige que todas as etapas na gestão laboratorial sejam eficientes, rápidas e seguras, desde a chegada do paciente até a emissão e entrega de laudos. Para que isso aconteça, é necessário que todos esses processos estejam unificados em um bom sistema de gestão, contribuindo para a minimização de erros e gastos desnecessários em toda a rotina laboratorial. Objetivou-se nesse trabalho realizar uma caracterização das principais ferramentas e funcionalidades encontradas nos softwares para gerenciamento laboratorial de análises clínicas disponíveis no mercado atualmente. Realizou-se uma revisão e levantamento de informações em vários sites comerciais disponíveis na internet, sendo selecionados quinze softwares para avaliação. A partir de uma análise dos mesmos, caracterizou-se os recursos disponíveis nos diferentes sistemas de gerenciamento laboratorial, definindo quais são os recursos básicos, ou seja, fundamentais para a utilização

de um software laboratorial, bem como os recursos adicionais, para complementar as ferramentas básicas disponibilizadas e oferecer maior praticidade. Todas funções apresentadas estão relacionadas a caracterização de um bom sistema de gerenciamento laboratorial e devem ser analisadas para a escolha adequada do melhor software de acordo com as necessidades. O software escolhido deve integrar as ferramentas indispensáveis para oferecer o suporte técnico necessário, a fim de assegurar um bom desempenho de todos os processos laboratoriais. Vale ressaltar que o uso da tecnologia deve ser sempre aliado às boas práticas de laboratório para otimização dos recursos pessoais e materiais, obtendo-se bons resultados de forma ética.

**PALAVRAS - CHAVE:** Softwares. Análises Clínicas. Gerenciamento laboratorial.

### SOFTWARES FOR LABORATORIAL MANAGEMENT: THE USE OF TECHNOLOGY IN FAVOR OF SCIENCE AND COMMUNITY

**ABSTRACT:** The proper functioning of a clinical laboratory requires that all stages in laboratory management be efficient, fast and safe, from the arrival of the patient to the issuance and delivery of reports. For that to happen, it is necessary that all these processes are unified in a good management system, contributing to the minimization of errors and unnecessary expenses throughout the laboratory routine. The objective of this work was to characterize the main tools and functionalities found in laboratory management software for clinical analysis currently available in

the market. A review and survey of information were made in several commercial websites available on the Internet and fifteen software was selected for evaluation. Based on the analysis of these software, the resources available in the different laboratory management systems were characterized, defining which are the basic resources, in other words, the fundamental resources for the use of laboratory software, as well as the additional resources to complement the tools available and offer a greater practicality. All the functions presented are related to the characterization of a good laboratory management system and should be analyzed for an appropriate choice of the best software according to the needs. The chosen software must integrate the indispensable tools to offer the necessary technical support in order to ensure a good performance of all the laboratory processes. It is worth mentioning that the use of technology must always be combined with good laboratory practices, optimizing the personal and material resources, obtaining good results in an ethical way.

**KEYWORDS:** Softwares. Clinical Analysis. Laboratorial Management.

## 1 | INTRODUÇÃO

Os avanços tecnológicos estão cada vez mais presentes no dia a dia da sociedade atual e se apresentam nos mais variados formatos com o objetivo de gerar diversos benefícios para a comunidade através de seu uso como por exemplo, maior agilidade, comodidade e praticidade na realização de tarefas.

Neste sentido, a internet surgiu no ano de 1969 nos Estados Unidos com o objetivo inicial de interligar laboratórios de pesquisa, a fim de facilitar as estratégias durante a Guerra Fria. O seu aprimoramento relativamente rápido ao longo do tempo, trouxe grandes avanços para a sociedade por gerar possibilidades até então, não existentes, mas que hoje, se tornaram comuns e essenciais, como o envio de e-mails, por exemplo. [1]

Além disso, o uso de computadores, internet, serviços online, dispositivos móveis e Smartphones se tornou fundamental para as indústrias, empresas, prestadores de serviços e pessoas. A praticidade em utilizar as tecnologias disponíveis raramente é dispensada. A tecnologia pode ser utilizada de diferentes formas e através de diversos formatos, incluindo sistemas para gerenciamento de negócios e processos.

Softwares são programas de computadores que permitem executar diversas funções de acordo com os objetivos pré-estabelecidos. Os softwares podem ser classificados em três tipos: software de sistema, programação e aplicação. [2]

Os softwares de sistema são constituídos pelos sistemas operacionais que reconhecem os comandos executados pelos usuários e transformam esses comandos em dados e códigos processáveis pelo equipamento. Os softwares de programação são programas que, através de linguagens de programação, são utilizados para criar outros softwares. [2]

Já os softwares de aplicação, possibilitam que o usuário realize uma série de tarefas específicas em diferentes áreas de atividade como, por exemplo, educação, medicina,

engenharia, contabilidade e outras áreas. [2]

Para laboratórios de Análises Clínicas o uso da tecnologia vem sendo bastante comum e, de fato, possibilita avanços em diversos aspectos, tais como agilidade no atendimento, minimização de erros e praticidade na entrega dos resultados.

Neste contexto, o uso de sistemas para gerenciamento dos processos laboratoriais vem crescendo e isso requer uma atenção quanto ao que está sendo ofertado e como a tecnologia pode beneficiar a comunidade que necessita desta prestação de serviço. [3]

O bom funcionamento de um laboratório de análises clínicas exige que todas as etapas na gestão laboratorial sejam eficientes, rápidas e seguras, desde a chegada do paciente até a emissão e entrega de laudos. Para que isso aconteça, é necessário que todos esses processos estejam unificados em um bom sistema de gestão, sendo possível garantir o gerenciamento e o acompanhamento de todo o fluxo laboratorial com amplo controle das diversas áreas. [4,5]

No mercado atual, existem vários softwares que possibilitam essa integração e gerenciamento das diversas etapas e áreas laboratoriais, contribuindo para a minimização de erros e gastos desnecessários em toda a rotina laboratorial. Apresentando funções na coleta, triagem, controle de qualidade, e interfaceamento com equipamentos de análises. [4,5]

Com a grande variedade de softwares existentes no mercado, a escolha pode se tornar complexa sendo necessário padronizar desde as principais e mais básicas funções até ferramentas operacionais mais sofisticadas, para desta forma, facilitar a escolha de um sistema que se adapte aos objetivos e garantam a utilização de funções que se ajustem a realidade do laboratório a ser empregado. [4-6]

Diante das informações apresentadas, esse trabalho tem como objetivo apresentar as características das principais ferramentas e funcionalidades encontradas nos softwares para gerenciamento laboratorial (com ênfase se análises clínicas) disponíveis no mercado atualmente.

## 2 | METODOLOGIA

No presente trabalho realizou-se uma pesquisa exploratória em sites comerciais disponíveis na internet. A partir desta pesquisa, quinze softwares presentes no mercado foram selecionados e analisados quanto a caracterização dos recursos disponíveis nos diferentes sistemas de gerenciamento laboratorial em análises clínicas. [7-16]

O critério utilizado para classificação do recurso como função básica ou adicional foi a frequência de disponibilização da função entre os softwares analisados e a sua inclusão nos planos mais simples ou apenas nos mais completos.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos dados coletados na pesquisa foram analisados e identificados quais são os recursos básicos, ou seja, fundamentais para a utilização de um software laboratorial, bem como, os recursos adicionais.

Os recursos básicos são aqueles comuns na maior parte dos sistemas e, por isso, considerados como funções essenciais para compor qualquer software de gerenciamento para laboratórios de análises clínicas.

Já os recursos adicionais, apesar de não serem fundamentais para o andamento dos processos de trabalho diário, podem ser adquiridos separadamente para aderir maior praticidade, agilidade e outros benefícios para as rotinas laboratoriais. Ou seja, é possível trabalhar utilizando apenas os recursos básico, porém, a disposição dos recursos adicionais otimiza ainda mais o tempo de trabalho e facilita ainda mais as práticas realizadas.

### 3.1 Funções essenciais

As funções definidas como essenciais são:

#### *3.1.1 Controle do tempo de atendimento e espera por prioridade*

Uma vez que o paciente dá entrada no laboratório, o sistema deve gerar uma senha individual impressa de atendimento. Pode-se escolher a opção de gerar senhas para atendimento prioritário, o que acarretará na diminuição do tempo de atendimento ao paciente, respeitando a ordem de chegada e a prioridade estabelecida por lei. [7-16]

#### *3.1.2 Cadastro único do paciente para vários médicos, convênios e guias*

Utilizados em casos nos quais o paciente retorna ao laboratório para realizar exames a pedido de outros médicos, utilizando outros convênios ou guias. Para isto, é necessário que o software empregado consiga reciclar todos os dados cadastrados nos atendimentos anteriores, gerando um único cadastro para o paciente e, assim, evitando cadastros duplicados. [7-16]

#### *3.1.3 Impressão de etiquetas para amostras*

Recurso necessário a cada emissão de pedido de exame. O sistema deve gerar e imprimir etiquetas com código de barras para identificação das amostras, evitando eventuais trocas ou falhas de identificação. [7-16]

#### *3.1.4 Avisos por SMS e/ou e-mail*

Recurso utilizado para aviso automático ao paciente através do número de telefone (via SMS) ou e-mail cadastrados, informando-o sobre a liberação dos laudos já disponíveis,

agilizando as entregas. [7-16]

### 3.1.5 Emissão de resultados via Web

Caso o paciente prefira não voltar ao laboratório para obter o resultado dos exames realizados, o software deve disponibilizar uma cópia do laudo assinada digitalmente pelo responsável técnico em uma plataforma online, onde o paciente pode acessar através de um login e senha via internet. [7-16]

### 3.1.6 Gestão de compras e estoque

Utilizado para evitar que ocorra falta de suprimentos para o laboratório. O sistema deve controlar o estoque de materiais e insumos utilizados, informando através de alertas automáticos, quando for necessário realizar compras e reposição. [7-16]

### 3.1.7 Armazenamento online

O sistema deve ser totalmente online, com hospedagem em nuvens e backups automáticos realizados constantemente para garantir maior segurança, mobilidade e economia em hardware. [7-16]

### 3.1.8 Controle financeiro

Controle total do fluxo do caixa da empresa, registrando o faturamento completo em versões TISS de convênios particulares e SUS. Além disso, promover o controle de contas a receber e pagar, mantendo o controle do faturamento, e com o fim de se evitar prejuízos financeiros (Figura 1). [7-16]

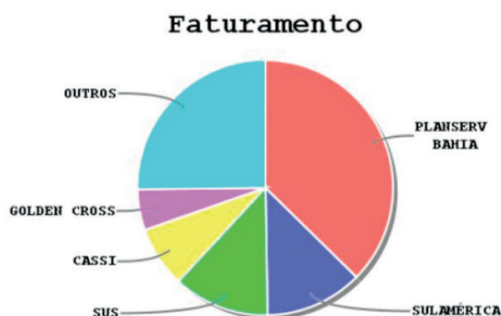


Figura 1: Tela do sistema demonstrando em gráfico o faturamento com planos particulares de saúde e SUS.

Fonte: Marsoft. Labol: softwares para laboratórios de análises clínicas [página na internet]. Disponível em: <http://www.marsoft.com.br/marsoft/>. [13]

## 3.2 Funções adicionais

Além das funções descritas como essenciais, existem outras funções que podem ser consideradas adicionais para complementar os recursos disponibilizados e oferecer maior praticidade além dos requisitos básicos.

### 3.2.1 *Integração com laboratórios de apoio*

Utilizado frente a conexão automatizada com os principais laboratórios de apoio, importante e necessária para acesso a cadastros de exames integrados, impressão de etiquetas primárias para identificar amostras do solicitante e autorização automática de pedidos. Isto, reduz o trabalho manual e minimiza as chances de erros de comunicação. [7-16]

### 3.2.2 *Laudos personalizados*

A maioria dos softwares encontrados possuem modelos de laudos personalizados, como por exemplo, valores de referência por idade e sexo atualizados, facilitando o trabalho do usuário. Sendo possível ainda, personalizar também seu layout, adicionar imagens citológicas e histórico do paciente. [7-16]

### 3.2.3 *Conferência, liberação e assinaturas eletrônicas*

Utilizado para conferir maior segurança. Os resultados dos exames devem ser conferidos na tela e depois liberados por um profissional responsável através de uma senha individual. Cada exame deve conter a identificação do profissional que o liberou e os laudos automaticamente serão emitidos com a assinatura daquele profissional responsável pelos resultados dos exames realizados. [7-16]

### 3.2.4 *Rastreabilidade completa dos dados*

Consiste em um recurso para o controle integral do laboratório. Backups armazenados em nuvem de cada etapa da realização dos exames com informações de data, hora e qual usuário realizou, garantindo a segurança da empresa. [7-16]

### 3.2.5 *Controle gerencial*

Os setores do laboratório podem ser visualizados através de um Painel de Controle como o mostrado na figura 2.



Figura 2: Controle gerencial através do Pannel de Controle de todos os setores laboratorial.

Fonte: Marsoft. Labol: softwares para laboratórios de análises clínicas [página na internet]. Disponível em: <http://www.marsoft.com.br/marsoft/>. [13]

O software possibilita a emissão de relatórios com gráficos em apresentações ricas e visuais, que demonstram todo faturamento, a quantidade de atendimentos e exames realizados em determinado período de tempo (Figura 3). Além de detectar em tempo real atrasos no atendimento, emissão de laudos e controle de estoque. [7-16]

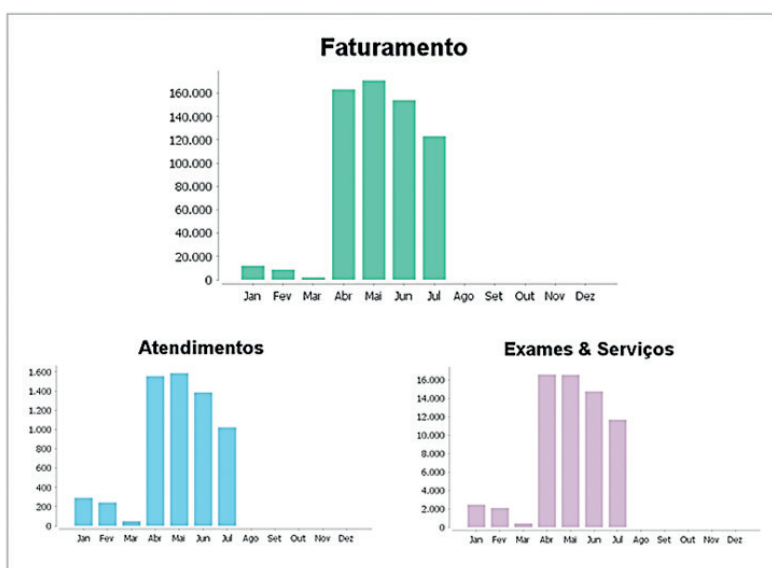


Figura 3: Estatísticas de faturamento, atendimentos e exames & serviços.

Fonte: Marsoft. Labol: softwares para laboratórios de análises clínicas [página na internet]. Disponível em: <http://www.marsoft.com.br/marsoft/>. [13]



### 3.2.6 Controle interno de qualidade integrado ao interfaceamento

Trata-se de um gerenciamento e controle de vários equipamentos laboratoriais através do interfaceamento automatizado. Permite a atuação de todo o processo de qualidade interna, emissão dos gráficos de Levey-Jennings (Figura 4), realizando estatísticas para cálculos de média, desvio padrão, coeficiente de variação para a análise comparativa entre equipamentos, além de rejeitar e/ou bloquear resultados e rotinas, exigindo a intervenção imediata dos responsáveis para a continuidade da produção. [7-16]

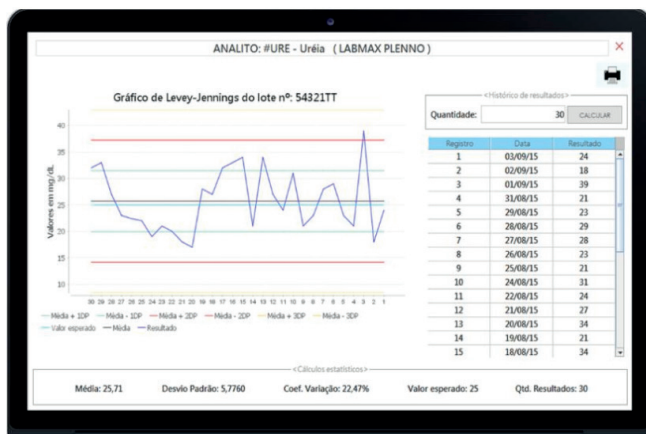


Figura 4: Tela de software demonstrando o controle de qualidade interno.

Fonte: Marsoft. Labol: softwares para laboratórios de análises clínicas [página na internet]. Disponível em: <http://www.marsoft.com.br/marsoft/>. [13]

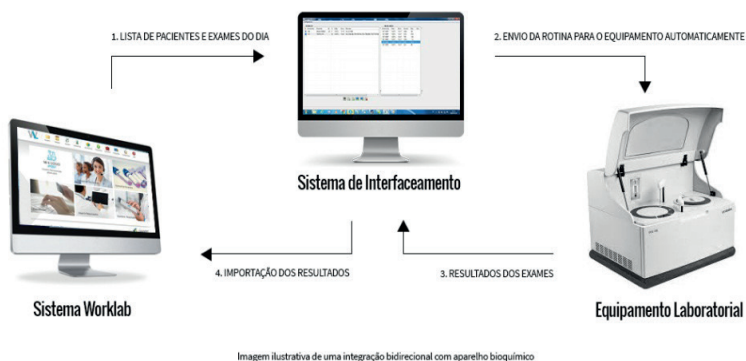


Figura 5: Demonstração do interfaceamento dos softwares com aparelhos de análises.

Fonte Criasoft sistemas. Worklab: soluções em softwares para laboratórios e outras áreas da saúde [página na internet]. Disponível em: <https://criasoft.com.br>. [9]

Os resultados interfaceados devem chegar ao sistema já digitados, necessitando apenas da liberação do responsável técnico para estarem, em tempo real, a disposição para impressão e acesso via Web, garantindo rapidez e segurança dos resultados. [7-16]

## 4 | CONCLUSÃO

As funções apresentadas estão relacionadas a caracterização de um bom sistema de gerenciamento laboratorial, assim tais funções devem ser analisadas para a escolha adequada dos softwares de acordo com as necessidades.

Este software deve integrar as ferramentas indispensáveis para oferecer todo o suporte técnico necessário, a fim de assegurar um bom desempenho de todas as etapas e processos que compõem o funcionamento de um laboratório de análises clínicas.

As demais funções complementares devem ser analisadas e avaliadas de acordo com as rotinas e processos do laboratório no qual será utilizado, para definir quais serão úteis e quais serão dispensáveis para o laboratório em questão.

Vale ressaltar que o uso da tecnologia deve ser sempre aliado às boas práticas de laboratório para otimização dos recursos pessoais e materiais, obtendo-se bons resultados de forma ética.

## REFERÊNCIAS

[1] Rosa, AM. **As origens históricas da Internet: uma comparação com a origem dos meios clássicos de comunicação ponto a ponto.** Estudos em Comunicação, Portugal. 2012; 11: 95-123.

[2] Monteiro, LP. **Tipos de software e suas classificações.** [publicação na web]. Universidade da Tecnologia. Acesso em 03 de março de 2019. Disponível em: <https://universidadedatecnologia.com.br/tipos-de-software-e-suas-classificacoes/>.

[3] SEBRAE. **Como montar um laboratório de análises clínicas.** [publicação na web]. 2017. Acesso em 20 de abril de 2019. Disponível em: <http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/ideias/Como-montar-umlaborat%C3%B3rio-de-an%C3%A1lises-cl%C3%ADnicas>.

[4] Píxeon. **Quais os padrões de softwares para laboratório que trazem mais benefícios.** [página na internet]. Acesso em 13 de março de 2019. Disponível em: <https://www.píxeon.com/blog/software-para-laboratorio/>.

[5] Uniware. Unilab. **Como escolher um sistema para laboratório de análises clínicas.** [página na internet]. Acesso em 08 de março de 2019. Disponível em: <https://www.unilab.com.br/materiais-educativos/artigos/como-escolher-um-sistema-para-laboratorio-de-analises-clinicas/>.

[6] Concent Sistemas. [página na internet]. Acesso em 05 de março de 2019. Disponível em: <https://www.concentsistemas.com.br>.

[7] Ans sistemas. [página na internet]. ANS Laboratório. Acesso em 05 de março de 2019. Disponível em: <http://www.analisesistemas.com/AnaliseLaboratorio.php>.

[8] Aurelio M. **LabNet: softwares para laboratórios**. [página na internet]. Acesso em 23 de janeiro de 2019. Disponível em: <http://www.labnet.com.br/apresentacao.php>.

[9] Criasoft sistemas. **Worklab: soluções em softwares para laboratórios e outras áreas da saúde**. [página na internet]. Acesso em 05 de março de 2019. Disponível em: <https://criasoft.com.br>.

[10] Fit inovação. **Labsolution**. [página na internet]. Acesso em março de 2019. Disponível em: <http://labsolution.com.br/>.

[11] Grupo Sym. **Autolac: soluções integradas em software para laboratórios**. [página na internet]. Acesso em 24 de fevereiro de 2019. Disponível em: <https://autolac.com.br/>.

[12] Karyon. **Facelab: sistema de interface laboratorial**. [página na internet]. Acesso em 03 de abril de 2019. Disponível em: <http://www.facelab.com.br/>.

[13] Marsoft. **Labol: softwares para laboratórios de análises clínicas**. [página na internet]. Acesso em 03 de abril de 2019. Disponível em: <http://www.marsoft.com.br/marsoft/>

[14] Proditec Sistemas. **Sistema SCOLA**. [página na internet]. Acesso em 13 de março de 2019. Disponível em: <http://www.proditec.com.br>.

[15] Shift. **Shift Lis**. [página na internet]. Acesso em 08 de março de 2019. Disponível em: <https://shift.com.br/>.

[16] Soitic. **Labsys web: sistema de soluções para gestão de laboratórios de análises clínicas**. [página na internet]. Acesso em 23 de janeiro de 2019. Disponível em: <https://www.labsysweb.com.br/>.

[17] Techmobil. **Sistema VIDA**. [página na internet]. Acesso em 08 de março de 2019. Disponível em: <https://www.sisvida.com.br>.

[18] Web brasilíia info. **Apluslab**. [página na internet]. Acesso em 14 de março de 2019. Disponível em: <https://www.webbrasilíia.com/apluslab/>.

## **SOBRE A ORGANIZADORA**

**ÉRICA DE MELO AZEVEDO** - Possui Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (2019), Graduação em Química com Atribuições Tecnológicas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (2012) e complementação pedagógica para exercício da docência na Faculdade Souza Marques (2015). É docente efetiva do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro Campus Duque de Caxias (IFRJ CDuC) e ministra aulas de Química Geral e Inorgânica para turmas da Graduação e Ensino Médio/Técnico e aulas de análise térmica aplicada à alimentos para turmas da Pós-Graduação. Atualmente é vice-coordenadora de Extensão do IFRJ CDuC. Coordena e colabora com projetos de pesquisa desenvolvidos no IFRJ e colabora em projetos de pesquisa financiados pelo CNPq e desenvolvidos na Escola de Química da UFRJ na área de Tecnologia Química, análise térmica e tratamento térmico de resíduos. Orientou e participou de bancas de trabalhos de conclusão de curso nos temas citados. Têm atuado como membro de comissões julgadoras de editais de fomento à pesquisa e bolsas de iniciação científica do CNPq no âmbito do IFRJ. Publicou artigos em revistas nacionais e internacionais na área de Análise Térmica e na área de Ensino a Distância. Desde 2016 é revisora do renomado periódico Journal of Thermal Analysis (JTAC). Atuou como organizadora de e-books e autora de capítulos de livros publicados na área de Química e Engenharia Química pela Atena Editora

## ÍNDICE REMISSIVO

### SÍMBOLOS

1,1-difenil-2-picril-hidrazila 20, 23

#### A

Alginato 68, 71, 72, 74, 75, 76, 77, 78, 79

Aminoácidos 6, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 33, 45, 60

Análises Clínicas 5, 81, 83, 84, 89, 90

Atividade Antioxidante 6, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 68, 69

#### B

Biofilme dentário 10

#### C

Carboidrato 45, 59

Compostos fenólicos 20, 22, 26, 69

Croton urucurana Baill 7, 59, 60, 61, 62, 67

#### D

Diabetes 22, 42, 43, 44, 48, 50, 53, 55, 56, 57

#### E

Enzimas digestivas 6, 42, 44, 54

Espectrofluorescência 29

#### F

Farelo de arroz 6, 1, 2, 3, 6, 7

Fermentado 6, 1, 3, 5, 6

Folin–Ciocalteu 20, 21, 23, 26

#### G

Gerenciamento laboratorial 7, 81, 83, 89

#### I

Imobilização 7, 68, 70, 71, 74, 76, 78

#### M

Metilparation 6, 29, 31, 32

#### O

Obesidade 42, 43, 44, 48, 49, 50, 51, 54

## **P**

Propil Galato 7, 68, 69, 70, 73, 77, 78

## **S**

*Saccharomyces cerevisiae* 6, 1, 2, 3, 5, 7

Síndrome Metabólica 42, 43, 44, 48, 54

Softwares 5, 7, 81, 82, 83, 85, 86, 87, 88, 89, 90

Soro de peixe 29, 35

## **T**

Tanino acil hidrolase 68

## **Z**

*Zingiber officinale* 6, 9, 10, 11, 13, 16, 17, 18, 19

# Ensino e Pesquisa em Bioquímica



🌐 [www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)  
✉ [contato@atenaeditora.com.br](mailto:contato@atenaeditora.com.br)  
📷 @atenaeditora  
📘 [www.facebook.com/atenaeditora.com.br](https://www.facebook.com/atenaeditora.com.br)

**Atena**  
Editora  
Ano 2021

# Ensino e Pesquisa em Bioquímica



🌐 [www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)  
✉ [contato@atenaeditora.com.br](mailto:contato@atenaeditora.com.br)  
📷 @atenaeditora  
📘 [www.facebook.com/atenaeditora.com.br](https://www.facebook.com/atenaeditora.com.br)

**Atena**  
Editora  
Ano 2021