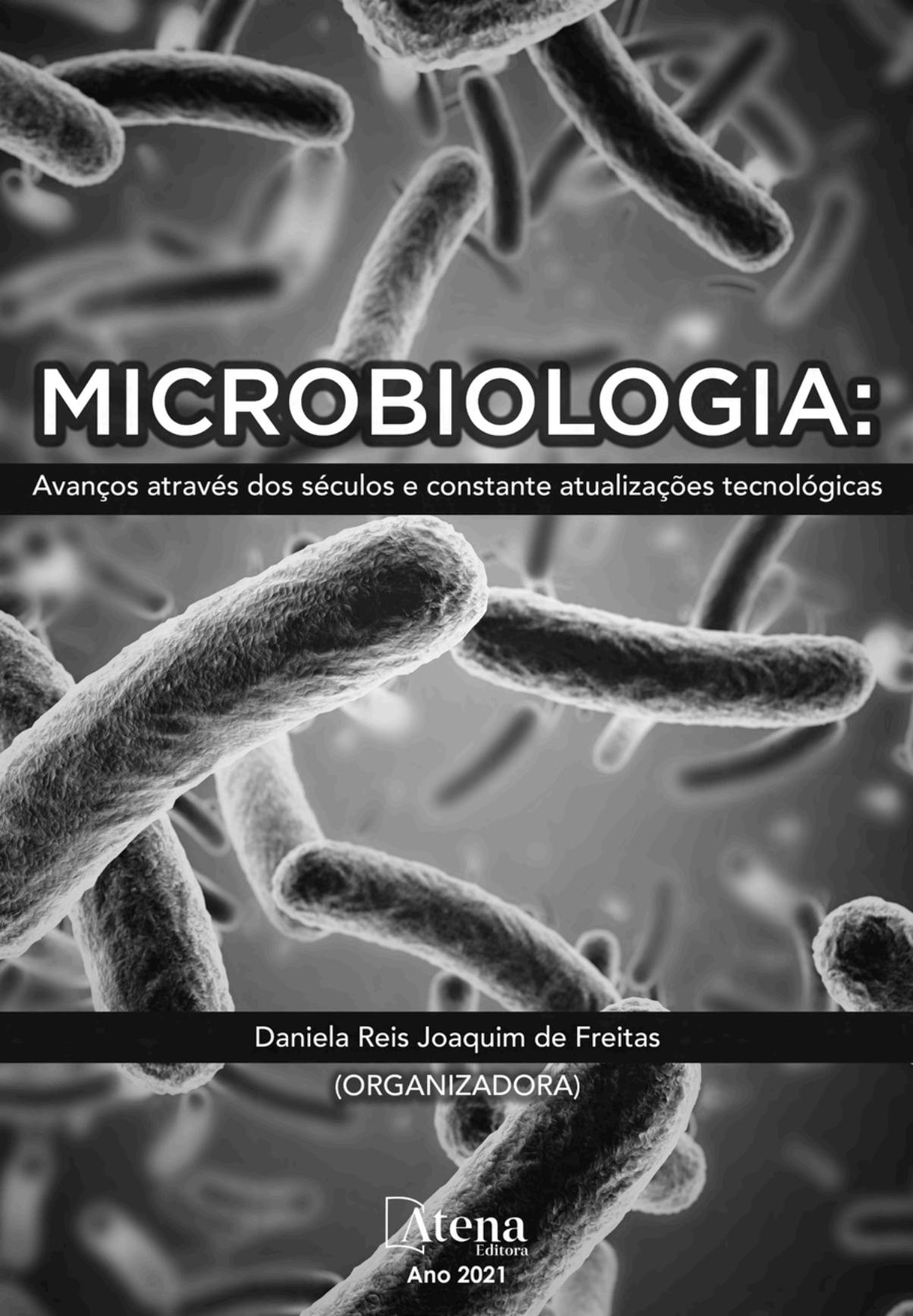


MICROBIOLOGIA:

Avanços através dos séculos e constante atualizações tecnológicas

Daniela Reis Joaquim de Freitas
(ORGANIZADORA)

**Atena**
Editora
Ano 2021



MICROBIOLOGIA:

Avanços através dos séculos e constante atualizações tecnológicas

Daniela Reis Joaquim de Freitas
(ORGANIZADORA)

**Atena**
Editora
Ano 2021

Editora chefe

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Editora executiva

Natalia Oliveira

Assistente editorial

Flávia Roberta Barão

Bibliotecária

Janaina Ramos

Projeto gráfico

Camila Alves de Cremo

Daphynny Pamplona

Gabriel Motomu Teshima

Luiza Alves Batista

Natália Sandrini de Azevedo

Imagens da capa

iStock

Edição de arte

Luiza Alves Batista

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.

Open access publication by Atena Editora



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 Biológicas e da Saúde**

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

Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas

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

Profª Drª Daniela Reis Joaquim de Freitas – Universidade Federal do Piauí

Profª Drª 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
Profª Drª Elizabeth Cordeiro Fernandes – Faculdade Integrada Medicina
Profª Drª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Profª Drª Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Fernanda Miguel de Andrade – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Dr. Fernando Mendes – Instituto Politécnico de Coimbra – Escola Superior de Saúde de Coimbra
Profª Drª Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Helio Franklin Rodrigues de Almeida – Universidade Federal de Rondônia
Profª Drª Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. 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
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Maria Tatiane Gonçalves Sá – Universidade do Estado do Pará
Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federacão 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
Profª Drª Regiane Luz Carvalho – Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino
Profª Drª Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora
Profª Drª Vanessa da Fontoura Custódio Monteiro – Universidade do Vale do Sapucaí
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Welma Emidio da Silva – Universidade Federal Rural de Pernambuco

Microbiologia: avanços através dos séculos e constante atualizações tecnológicas

Diagramação: Camila Alves de Cremo
Correção: Bruno Oliveira
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores
Organizadora: Daniela Reis Joaquim de Freitas

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M626 Microbiologia: avanços através dos séculos e constante atualizações tecnológicas / Organizadora Daniela Reis Joaquim de Freitas. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2021.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-65-5983-633-8

DOI: <https://doi.org/10.22533/at.ed.338212311>

1. Microbiologia. I. Freitas, Daniela Reis Joaquim de (Organizadora). II. Título.

CDD 579

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora

Ponta Grossa – Paraná – Brasil

Telefone: +55 (42) 3323-5493

www.atenaeditora.com.br

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; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.

DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Atena Editora declara, para os devidos fins de direito, que: 1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, direito sobre a publicação, inclusive não constitui responsabilidade solidária na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código Penal e no art. 927 do Código Civil; 2. Autoriza e incentiva os autores a assinarem contratos com repositórios institucionais, com fins exclusivos de divulgação da obra, desde que com o devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial; 3. Todos os e-book são *open access*, desta forma não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de *e-commerce*, ou qualquer outro meio virtual ou físico, portanto, está isenta de repasses de direitos autorais aos autores; 4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro; 5. Não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra.

APRESENTAÇÃO

A Microbiologia é uma das áreas da Ciências Biológicas que mais cresceu nas últimas décadas. Seu emprego na área da indústria alimentícia, farmacêutica, de reciclagem, biotecnológica entre outras tem sido enorme; e a compreensão de quadros patológicos causados por diferentes micro-organismos em humanos, animais e até em plantas tem sido favorecida devido aos avanços tecnológicos na área médica e de diagnóstico laboratorial.

O livro “Microbiologia: Avanços através dos séculos e constantes atualizações tecnológicas” é uma obra atualizada, composta por trabalhos científicos na forma de artigos originais e de revisão, todos relacionados a esta área de conhecimento, que vai desde o cultivo e triagem de micro-organismos a análise da atividade antibacteriana de extratos de plantas, ou atividade de enzimas ou de fermentação de micro-organismos na indústria alimentícia, e até formação de biofilme e atividade antifúngica de diferentes moléculas.

São 9 capítulos nos quais serão discutidos avanços desta área da ciência e serão revistos conceitos importantes dentro da Microbiologia básica, Bacteriologia e Micologia, além de discutir o papel da tecnologia para a obtenção dos resultados encontrados. A discussão destes temas é feita de forma dinâmica e facilitada, com uma linguagem acessível para estudantes e profissionais.

Este livro, assim como todas as publicações da Atena Editora, passou pela revisão de um Comitê de pesquisadores com mestrado e doutorado em programas de pós-graduação renomados no Brasil. O resultado disto é um trabalho de excelente qualidade, atualizado e devidamente revisado por pares que será apresentado a você, nosso leitor.

Boa leitura!

Daniela Reis Joaquim de Freitas

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1..... 1

ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS FOLHAS E FLORES DA *Turnera subulata* (FLOR DO GUARUJÁ)

Maria Lucidalva Ribeiro de Sousa
Isabela Ribeiro de Albuquerque
Luana Priscilla Roque Moura
Bruna Silva da Rocha
Kelly Cristina da Silva Martins
Janaína da Costa Nogueira
Adriana Dantas Gonzaga de Freitas

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.3382123111>

CAPÍTULO 2..... 11

APLICAÇÃO DE ENZIMAS EM INDÚSTRIAS ALIMENTÍCIAS

Mylena Sales Palma Passos
Adeline Cristina Pereira Rocha
Thiago Machado Pasin
Vivian Machado Benassi

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.3382123112>

CAPÍTULO 3..... 27

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EXTRATO DA CASCA E POLPA DO TUCUMÃ (*Astrocaryum aculeatum*) FRENTE A BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

Maria Lucidalva Ribeiro de Sousa
Isabela Ribeiro de Albuquerque
Luana Priscilla Roque Moura
Bruna Silva da Rocha
Kelly Cristina da Silva Martins
Janaína da Costa Nogueira
Adriana Dantas Gonzaga de Freitas

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.3382123113>

CAPÍTULO 4..... 36

LIPASES: REVISÃO E APLICAÇÃO INDUSTRIAL

Rafaela Lopes da Silveira
Adeline Cristina Pereira Rocha
Vivian Machado Benassi

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.3382123114>

CAPÍTULO 5..... 50

AVALIAÇÃO *IN SILICO* DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL FOLIAR DE COLÔNIA (*Alpinia zerumbet*)

Suelen Carneiro de Medeiros
Igor Lima Soares
Gleilton Weyne Passos Sales

Mary Anne Medeiros Bandeira

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.3382123115>

CAPÍTULO 6..... 61

PRINCIPAIS MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS NA FERMENTAÇÃO DE ALIMENTOS

Taynara Ellen Romero Batistela

Dâmaris Cristine Landgraf

Daniele Cassiano Feliciano

Sara Mataroli de Godoy

Daniele Sartori

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.3382123116>

CAPÍTULO 7..... 68

QUALIDADE HIGIÊNICO SANITÁRIA E FÍSICO-QUÍMICA DA CASTANHA-DO-BRASIL E SEUS DERIVADOS COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE CHAPECÓ - SC

Daniela Varnier

Filomena Marafon

Débora Carneiro Leite

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.3382123117>

CAPÍTULO 8..... 80

APLICACIÓN DE PCR Y MALDITOF EN LA IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS DEL GÉNERO *CANDIDA*

Alejandra Paula Espinosa Taxis

Débora Vázquez Domínguez

David Iván Loaiza Toscuento

Eulogio Valentín Gómez

Teresita Spezzia Mazzocco

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.3382123118>

CAPÍTULO 9..... 93

FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS Y SENSIBILIDAD A ANTIFÚNGICOS DE *Candida albicans*, *Candida tropicalis* Y *Candida glabrata*

Alejandra Paula Espinosa Taxis

Débora Vázquez Domínguez

David Iván Loaiza Toscuento

Teresita Spezzia Mazzocco

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.3382123119>

SOBRE A ORGANIZADORA..... 104

ÍNDICE REMISSIVO..... 105

CAPÍTULO 1

ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS FOLHAS E FLORES DA *Turnera subulata* (FLOR DO GUARUJÁ)

Data de aceite: 01/11/2021

Maria Lucidalva Ribeiro de Sousa

Universidade Federal do Amazonas
Campus Manaus
Manaus-Amazonas
<http://lattes.cnpq.br/0537904542958586>

Isabela Ribeiro de Albuquerque

Universidade Federal do Amazonas
Campus Manaus
Manaus-Amazonas
<http://lattes.cnpq.br/5809269430664505>

Luana Priscilla Roque Moura

Universidade Federal do Amazonas
Campus Manaus
Manaus-Amazonas
<http://lattes.cnpq.br/5803891252682779>

Bruna Silva da Rocha

Universidade Federal do Amazonas
Campus Manaus
Manaus-Amazonas
<http://lattes.cnpq.br/4370998953418048>

Kelly Cristina da Silva Martins

Universidade Federal do Amazonas
Campus Manaus
Manaus-Amazonas
<http://lattes.cnpq.br/9871152352695908>

Janaína da Costa Nogueira

Universidade Federal do Amazonas
Campus Manaus
Manaus-Amazonas
<http://lattes.cnpq.br/0479858840376122>

Adriana Dantas Gonzaga de Freitas

Universidade Federal do Amazonas
Campus Manaus
Manaus-Amazonas
<http://lattes.cnpq.br/3694117633635449>

RESUMO: As plantas são fontes de vários metabolitos ativos, que dão origem a vários fármacos comerciais, a partir da necessidade de testar novos artifícios para controlar a população de bactérias que acometem aos homens e animais, pois muitos compostos encontrados englobam diversas substâncias farmacologicamente ativas e assim como os produtos naturais podem ser uma boa fonte de novos compostos com atividade antibacteriana e fornecer futuros medicamentos para a diminuição de bactérias patogênicas causadoras de doenças. O objetivo neste estudo foi avaliar o potencial inibitório dos extratos metanólicos de *Turnera subulata* (flor/folha) sobre o crescimento bacteriano das cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13899) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Realizou-se a partir dos processos estático e ultrassom, a extração dos compostos orgânicos. Os extratos obtidos foram testados quanto ao seu efeito antibacteriano pelo método de disco de fusão com quatro repetições por concentração, as concentrações (mg/mL) utilizadas foram: C1 (0,010), C2 (0,015), C3 (0,020) e C4 (0,050) para cada extrato e observada por 72h, quando presentes, os halos foram medidos e retirados uma média para realização do teste estatístico de

Tukey a 95% de significância. Na faixa de inibição, destacou-se os que apresentaram melhor atividade que foram os extratos ultrassom e estático da flor, diferindo dos extratos com o tratamento com a folha, onde, observou-se 4,33 e 3,83mm de média diferindo do extrato da folha, e inibindo o crescimento da *E. Coli* e *S. aureus* ao redor do extrato. No presente estudo foi encontrado atividade antibacteriana nos extratos metanólicos com a folha e flor para as concentrações testadas, entretanto, são necessários estudos com variadas frações destes, considerando o baixo custo e facilidade na aquisição das plantas.

PALAVRAS-CHAVE: Antibacteriano, extratos metanólicos, *Turnera subulata*.

ANALYSIS OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF LEAVES AND FLOWERS OF THE *Turnera subulata* (GUARUJÁ FLOWER)

ABSTRACT: Plants are sources of several active metabolites, which give rise to several commercial drugs, from the need to test new devices to control the population of bacteria that affect humans and animals, as many compounds found encompass several pharmacologically active substances and as well as natural products can be a good source of new compounds with antibacterial activity and provide future medicines for decreasing disease-causing pathogenic bacteria. The aim of this study was to evaluate the inhibitory potential of methanol extracts of *Turnera subulata* (flower/leaf) on the bacterial growth of *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13899) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). From the static and ultrasound processes, the extraction of organic compounds was performed. The extracts obtained were tested for their antibacterial effect by the fusion disk method with four repetitions per concentration, the concentrations (mg/mL) used were: C1 (0.010), C2 (0.015), C3 (0.020) and C4 (0.050) for each extract and observed for 72h, when present, the halos were measured and an average was taken to perform the statistical test of Tukey at 95% significance. In the inhibition range, the ones that showed the best activity were highlighted, which were the ultrasound and static extracts of the flower, differing from the extracts with the treatment with the leaf, where 4.33 and 3.83mm of average differed from the extract. of the leaf, and inhibiting the growth of *E. Coli* and *S. aureus* around the extract. In the present study, antibacterial activity was found in the methanol extracts with the leaf and flower at the concentrations tested, however, studies with different fractions of these are necessary, considering the low cost and ease of acquiring the plants.

KEYWORDS: Antibacterial, methanolic extracts, *Turnera subulata*.

INTRODUÇÃO

A flora brasileira é muito rica e abriga diversas espécies de plantas com características que se diferencia de adaptação a ambientes, como as plantas daninhas, invasoras e ou espontâneas. As plantas produzem uma variedade de componentes orgânicos, que são divididos em dois grupos conhecidos como metabólitos primários (armazenam energia) e os secundários (garantem a sobrevivência e competição no ambiente), (VIZZOTTO et al., 2010). Segundo estudos, óleos essenciais, flavonoides, alcaloides, taninos e quinonas, todos isolados de plantas, são descritos na literatura por apresentarem atividades

biológicas, dentre elas atividade antibacteriana (SAVOIA, 2012).

Tendo uma variedade de compostos presentes nas plantas e frutos, como os polifenóis, são descritos como capazes de matar ou inibir o crescimento de microrganismos. Essas características são relevantes, principalmente em áreas tropicais, como a região amazônica, onde as condições climáticas propiciam o maior crescimento dos microrganismos (JOBIM et al., 2014)

A *T. subulata* conforme SILVA (2010) em um estudo utilizando a folha obteve a presença positiva de flavonóides e cicatrização em feridas abertas por meio do uso do extrato aquoso. A planta *T. subulata* é um arbusto denso perene, 30-80 cm de altura, com folhas lanceoladas ou estreita elíptica. Suas flores são formadas por pétalas que pode diferenciar do amarelo a brancas-amareladas de cor marrom na base. Suas flores se abrem logo pela manhã, depois de receber a luz direta do sol, e se fecham após o meio-dia (SHORT E COWIE, 2011).

O gênero *Turnera* vem sendo estudado sob vários aspectos e atividades, como exemplo antioxidante, anti-inflamatória, antiulcerogênica. estudaram o potencial antibiótico da *T. ulmifolia* frente a *Staphylococcus aureus*.; SANTOS, et al. (2010), avaliaram a atividade moluscicida e toxicidade frente artemia salina pelo extrato bruto de *T. ulifolia* conforme RAMASAMY et al, (2012) avaliaram o potencial antibacteriano do extrato etanólico das folhas de *T. ulmifolia* frente a bactérias gram negativas, bem como outros estudos com as espécies de *Turnera* tem obtido resultados positivos quanto suas aplicações.

Por meio de estudos, a flor do Guarujá vem sendo indicada como tratamento para ferimentos cutâneos e tumores (NITZ et al. 2006). Conforme BADKE et al (2011) a utilização de plantas para fins medicinais é tão antiga quanto o aparecimento da espécie humana na Terra. Os antigos povos já notavam que algumas plantas ou parte delas tinham princípios ativos os quais ao serem experimentados no combate a diversas doenças se demonstravam com potencial como: cura para ferimentos, infecções, sangramentos, dores, dentre outros males, revelaram empiricamente seu poder curativo.

Contudo, produtos naturais representam atualmente uma fonte detentora de novos compostos com atividade antibacteriana, capaz de fornecer novos medicamentos no combate de bactérias causadoras de doenças (MAIA, 2015).

Tendo em vista tais aspectos, este trabalho teve como objetivo investigar o potencial de ação antibacteriana dos extratos metanólicos da flor e folha da *T. subulata*, frente à inoculação das cepas bacterianas de *E. coli*; *S. aureus*; *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, em condições experimentais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta do Material Botânico

A *T. subulata* foi coletada no município de Manaus (AM) no mês de agosto, na Universidade Federal do Amazonas – UFAM com a coordenada geográfica 59° 59' 00" a 59° 57' 07" W de longitude e de latitude 03° 06' 30" a 03° 05' 00" S, foi identificada quanto à confirmação de gêneros e espécie no Laboratório de Botânica da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), e num momento posterior transportadas para Laboratório de Pesquisa em Microbiologia, no prédio 1 do ICB (Instituto de Ciências Biológicas). Sendo coletada no período da manhã, pois as flores da planta *T. subulata*, como observada fica aberta até as 12h.

Processamento do Material Vegetal

Após a coleta e identificação, da *T. subulata* selecionou-se as folhas e flores, e foram descartadas as que apresentaram fungos e insetos os materiais vegetais, os materiais passaram por assepsia, foram seco a temperatura ambiente para a retirada do excesso de água em seguida foram, pesados, seccionados, e levados para a estufa com circulação de ar à temperatura controlada, não ultrapassando 55 °C durante 5 a 7 dias, no Laboratório de Botânica da Universidade Federal do Amazonas – UFAM até completa desidratação. Após a secagem foram macerados com o auxílio de um liquidificador afim de obter-se o pó vegetal desidratado, que será utilizado na obtenção do extrato. Sendo que este processo foi repetido diversas vezes forma a adquirir quantidade necessária de amostras para a produção dos extratos.

Extração dos compostos a frio

Foram adicionado o material vegetal (50g) e o solvente extrator metanol 100%, sendo 500 ml em um Becker de 1000 ml por um período de 15 dias em temperatura ambiente (método de concentração estático). Os extratos obtidos foram filtrados e concentrados em rotaevaporador a 40°C, sob pressão reduzida. Após a obtenção dos extratos, os mesmos foram depositados em frascos de vidros e armazenados na geladeira para a realização dos bioensaios.

Extração por ultrassom

Os materiais com uma proporção de 50g de materiais vegetais processados para 500 ml de solvente extrator metanol foi depositado em um frasco de vidro, após levado ao ultrassom para agitar, misturar e extrair através das ondas mecânicas os compostos em um tempo de 30 minutos (CHEMAT et al., 2011; VILKHU et al., 2008) em seguida foi utilizado para a retirada do excesso de solvente o Rotaevaporador.

Ensaio de atividade antimicrobiana

Microrganismos

Os testes foram realizados no Laboratório de Microbiologia- UFAM, e para as realizações dos ensaios de atividade antibacteriana foram selecionadas as bactérias, de padrões internacionais (ATCC- American Type Culture Colletion) e uma cepa fúngica cedida pelo CBAM (Coleção de bactérias da Amazônia) do Instituto Leônidas e Maria Deane-FIOCRUZ, sendo elas: *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) *S. aureus* (ATCC25923) e *K. pneumoniae* (ATCC 13899), onde foram mantidas no meio de cultura Agar Muller-Hinton (MH) até o teste ser iniciado.

Preparo do inóculo microbiano

Para os testes de difusão em ágar as bactérias foram inoculadas em tubos de ensaios contendo 5 mL de meio MH para cada uma das cepas, onde cresceram em caldo por 24h em seguida, foi colocada em meio de cultura Ágar Muller-Hinton (MH) e encubado por 24 h. Para o preparo do inóculo, colônias obtidas em Ágar MH, foram utilizadas na obtenção de uma suspensão bacteriana por sua densidade celular padronizada pela turbidez ajustada conforme a escala 0,5 de McFarland.

Preparo dos extratos e do controle positivo e negativo

Para a produção dos extratos metanólicos foram utilizados dois métodos: Ultrassom e Estático. O método Ultrassom foi produzido no Laboratório de Abertura de Amostra e Ensaios Químicos (LAEQ) no Instituto de Ciências Exatas, e o método Estático no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia. Posteriormente os extratos passaram pelo processo de rotaevaporação e em seguida colocados em uma capela para uma completa retirada do solvente, após todo esse processo o extrato da *T. subulata* (folha e flor) foram pesados em quatro concentrações em mg/mL: C1(0,010), C2 (0,015), C3 (0,020) e C4 (0,050) com auxílio de uma balança analítica e transferidos para tubos de Eppendorf contendo 1ml de DMSO. A amostra foi agitada pelo vortex por 10 minutos para garantir melhor diluição dos extratos e em seguida foram colocados discos de papel filtro para cada extrato. Para o controle positivo (antibiótico) tetraciclina foi preparado a uma concentração de 50 µl em tubo Eppendorf e agitado, em seguida colocado discos de papel filtro dentro para melhor absorção. O controle negativo foi dado através do DMSO sendo separado em um tubo 1ml e posto dentro discos.

Avaliação da atividade antibacteriana

Para a avaliação da atividade antimicrobiana, foram utilizadas 4 cepas bacterianas selecionadas, sendo elas: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *K. pneumoniae*, as bactérias foram reativadas em caldo Muller-Hinton (MH) e em seguida espalhadas em placas Petri contendo meio de cultura Ágar Muller-Hinton (MH), em quatro repetições, cada qual contendo

4 discos com diferentes concentrações mg/mL: C1 (0,010), C2 (0,015), C3 (0,020) e C4 (0,050) no papel filtro com 0,5 milímetros cada, todos foram embebidos com os extratos metanólicos de *T. subulata* (folha/flor), tendo ainda os outros dois com Dimetilsulfóxido (DMSO) controle negativo e antibiótico (tetraciclina) controle positivo, os discos foram posicionados mantendo-se uma distância razoável entre si para evitar interferências entre os possíveis halos de inibição.

As placas foram incubadas a 35°C em câmaras climatizadas B.O.D (Biological Oxygen Demand) por 72h, durante os quais foram observados o desenvolvimento dos microrganismos e o surgimento dos halos. Todos os testes foram realizados com quatro repetições por concentração.

Análise Estatística

Os experimentos foram feitos em quatro repetições por concentração, para a comparação de crescimento dos valores a partir de cada concentração, e os dados foram analisados através de Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey a 5% de significância. Para análise dos dados foi utilizado o programa com o software Sisvar, versão 5.6, segundo as recomendações de FERREIRA (2014). E feito a partir do Excel® as tabelas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação da atividade dos extratos

Observou-se nos testes realizado no laboratório de Microbiologia- UFAM que os extratos metanólicos estático e ultrassom da *T. subulata* folha e flor foram avaliados em relação a sua atividade antibacteriana através de difusão de discos e observados em 3 dias, utilizando-se os microrganismos *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *K. pneumoniae*.

Para o teste com o estático (Tabela 1), observou-se inibição nas concentrações para o extrato metanólico da flor, chegando a ficar na C3 (0,020) e C4 (0,050) onde obteve o seu melhor halo de 3,42 e 3,83mm respectivamente na média, inibindo o crescimento da bactéria *E. coli* e *S. aureus*, diferindo significativamente do teste com extrato da folha, que se manteve com quase todas as médias sem diferenças significativas conforme o teste Turkey, indicando o crescimento bacteriano ao redor desse extrato.

Conforme VASCONCELOS et al. (2004), quando o extrato vegetal é produzido a partir das folhas, a chance diminui para a concentração de agentes antimicrobianos, sendo assim uma eficácia maior as cascas das plantas, isso pode ser explicado ainda por vários fatores que possam contribuir para o crescimento do microrganismo ou não como, fatores físicos, pH, pressão osmótica e a temperatura que é essencial para a determinação da proliferação. Além de fatores químicos que envolvem os nutrientes necessários como carbono, oxigênio, nitrogênio e outros elementos minerais que servem para o metabolismo desses seres procariontes (TORTORA et al, 2012).

Cepa	Tratamento/Estático	C1 0,010	C2 0,015	C3 0,020	C4 0,050
<i>S. aureus</i>	Folha de <i>T. subulata</i>	1,50 a	2,33 a	2,70 a	2,75 a
	Flor de <i>T. subulata</i>	1,50 a	2,35 a	2,81 a	3,41 b
<i>E. coli</i>	Folha de <i>T. subulata</i>	1,50 a	1,55 a	1,56 a	1,71 a
	Flor de <i>T. subulata</i>	1,90 b	2,82 a	3,42 b	3,83 b
<i>P. aeruginosa</i>	Folha de <i>T. subulata</i>	1,30 a	1,31 a	1,31 a	1,32 a
	Flor de <i>T. subulata</i>	1,41 a	1,42 a	1,45 a	1,47 a
<i>K. pneumoniae</i>	Folha de <i>T. subulata</i>	-	-	-	-
	Flor de <i>T. subulata</i>	-	-	-	-

Médias seguidas pela mesma letra para cada bactéria não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. C= concentração/ mg/mL. (-) = não apresentou crescimento de halo de inibição frente ao extrato aplicado.

Tabela 1- Médias dos halos (mm) a partir das concentrações do extrato de *T. subulata*, utilizando o método Estático.

Para os extratos vindos da flor e folha da *T. subulata* (Tabela 2) as medidas de tratamento para o Ultrassom obtiveram uma média que não diferiu significativamente umas da outra em quase todo o tratamento, tendo uma diferença estatística visível no tratamento com o extrato com a flor uma vez que, inibiu o crescimento da *S. aureus*. SAVOIA, (2012) corrobora com a sua pesquisa, onde foi observado que na planta *T. subulata* tem como principais metabólitos secundários os, flavonóides, alcalóides, taninos, cumarinas, agliconas, antraquinônicas, triterpenos e/ou esteróides, saponinas e polifenóis, uma vez que, os óleos essenciais, flavonóides, alcalóides, taninos e quinonas, são descritos na literatura por apresentarem atividades biológicas, dentre elas atividade antibacteriana. SILVA (2010) observou em seu trabalho onde foi utilizado a planta *Turnera ulmifolia*, sendo que nessa planta obteve a presença positiva de cumarina e flavonóides no extrato aquoso a partir das folhas.

Cepa	Tratamento/Ultrassom	C1 0,10	C2 0,015	C3 0,020	C4 0,050
<i>S. aureus</i>	Folha de <i>T. subulata</i>	1,20 a	1,21 a	1,33 a	1,35 a
	Flor de <i>T. subulata</i>	2,41 b	2,72 b	3,72 b	4,33 b
<i>E. coli</i>	Folha de <i>T. subulata</i>	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,50 a
	Flor de <i>T. subulata</i>	1,55a	2,11 a	2,54 a	2,91 a
<i>P. aeruginosa</i>	Folha de <i>T. subulata</i>	-	-	1,00 a	1,00 a
	Flor de <i>T. subulata</i>	-	-	-	1,00 a
<i>K. pneumoniae</i>	Folha de <i>T. subulata</i>	-	-	-	-
	Flor de <i>T. subulata</i>	-	-	-	-

Médias seguidas pela mesma letra para cada bactéria não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. C= concentração/ mg/mL. (-) = não apresentou crescimento de halo de inibição frente ao extrato aplicado.

Tabela 2- Médias dos halos (mm) a partir das concentrações do extrato da *T. subulata*, utilizando o método Ultrassom.

No extrato etanólico da *T. subulata* Sm., ocorreu ausência de derivados antracênicos e saponinas. Em estudos realizados pelo laboratório de botânica, a partir de extratos com metanol e clorofórmio, provenientes de folhas de *T. subulata*, avaliando-se através de Cromatografia Gasosa - Espectroscopia de Massa, visualizou-se metabólitos secundários, como alcalóides, carboidratos, glicosídeos, saponinas, fitoesteróis e flavonoides, onde as saponinas apareceram no extrato aquoso, estando ausente no teste com clorofórmio e metanol (VIVEKRAJ et al, 2017)

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos por este trabalho permitem concluir que com extratos metanólicos de *T. subulata* (folha e flor) foram encontrada atividade antibacteriana, no entanto o que apresentou melhor atividade foi o extrato extraído a partir da flor da planta *T. subulata*, que teve eficiência contra a bactéria *S. aureus*, para os processos com estático e ultrassom. A investigação de ação bactericida de plantas pouco estudadas, se faz uma ferramenta valiosa, para composição de novos medicamentos contra microrganismos, perigosos e degradantes aos seres vivos. O trabalho evidenciou que através dos testes, é possível definir concentrações capazes de inibir bactérias, porém estudos são necessários para verificar menores concentrações.

REFERÊNCIAS

AZEVEDO, S., CAROLINE, M. Estudo do potencial biotecnológico da polpa de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) in natura e da conservação das suas propriedades nutricionais em embalagens a vácuo. 2016.

BADKE, M. R., BUDÓ, M. L. D., SILVA, F. M., RESSEL, L. B. 2011. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. Escola Anna Nery, v. 15, p.1, 2011.

CHEMAT, F.; ZILL-E-HUMA; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. Ultrason. Sonochem. 18. 813–835, 2011.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C., Química Nova na Escola, 1998.

FERRAZ, S.; LOPES, E. A.; AMORA, D. X. Controle de fitonematoides com o uso de extratos e óleos essenciais de plantas. In: POLTRONIERI, L. S.; ISHIDA, A. K. N. (Ed). Métodos alternativos de controle de insetos-praga, doenças e plantas daninhas. Panorama atual e perspectivas na agricultura. Belém: EMBRAPA Amazônia Oriental, p. 308. 2008.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 38, n. 2. 2014.

NITZ, A.C.; ELY, J. B.; D'ACAMPORA, A. J.; TAMES, D. R.; CORREA, B. P. Estudo morfométrico no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos, usando: *Coronopu didymus* e *Calendula officinali*. Arquivos Catarinenses de Medicina, Vol. 35, n 4, 2006.

RAMASAMY, SETHI, P.; D. Antibacterial activity of ethanolic of the leaves of *Turnera ulmifolia* linn. International Journal of Pharmaceutical Sciences and research. Vol 3, n 1, 2012.

ROZZATO, M. R. Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda* / Mariana Rodrigues Rozatto. – Araraquara, 2012.

SANTOS, N. C.; DIAS, C. N.; COUTINHO-MOARES, D. F.; VILANOVA, C. M.; GONÇALVES, J. R. S.; SOUZA, N. S.; ROSA, I. G. Toxicidade e avaliação de atividade moluscicida de folhas de *Turnera ulmifolia* L. Revista Brasileira de Biociências. Vol 8, n4, 2010.

SILVA, J. O. D. Avaliação das atividades antiinflamatória, antitumoral e citotóxica de extratos brutos de *Turnera ulmifolia* L. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco- UFPE, 2010.

SAVOIA, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. Future Microbiol; 7: 979-90, 2012.

SHORT, P. S. & COWIE, I. D. Flora of the Darwin Region. National Library of Australia Cataloguing-in-publication entry (PDF). Vol. 1, 2011.

SAVOIA, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. Future Microbiol; 7: 979-90, 2012.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. Microbiologia, Ed.10, Editora S.A, Artmed, Porto Alegre, RS, 2012.

Vivekraj P, Vinotha S, Vijayan A, Anand Gideon V. Preliminary Phytochemical Screening and GC-MS Analysis of Methanolic Extract of *Turnera subulata* Smith (Passifloraceae). *The Journal of Phytopharmacology*. 6(3): 174-177. 2017.

VIZZOTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E.B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. Documento: Embrapa Clima Temperado, Pelotas, n.316. p.7-15. 2010.

VILKHU, K.; MAWSON, R.; SIMONS, L.; BATES, D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. *Innov. Food Sci. and Emerg. Tech.* V 9, n.161–169, 2008.

VASCONCELOS M.C. A., A., Rodovalho, N. C. M., Pott, A., Pott, V. J., Ferreira, A. M. T., Arruda, A. L. A., & Bueno, N. R. Avaliação de atividades biológicas das sementes de *Stryphnodendron obovatum* Benth (Leguminosae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 14(2), 121-127. 2004.

VIANA, B.F; SILVA, F. O. Biologia e ecologia da polinização / organizadoras Blandina Felipe Viana e Fabiana Oliveira da Silva. - Salvador: EDUFBA, Rede Baiana de Polinizadores. 230 p.: il. - (Série Cursos de campo; v.2). 2010.

CAPÍTULO 2

APLICAÇÃO DE ENZIMAS EM INDÚSTRIAS ALIMENTÍCIAS

Data de aceite: 01/11/2021

Data de submissão: 20/09/2021

Mylena Sales Palma Passos

Universidade Federal dos Vales do
Jequitinhonha e Mucuri campus JK
Instituto de Ciência e Tecnologia
Diamantina – MG
<http://lattes.cnpq.br/2562870242287823>

Adeline Cristina Pereira Rocha

Universidade Federal dos Vales do
Jequitinhonha e Mucuri campus JK
Programa de Pós-Graduação em
Biocombustíveis
Diamantina – MG
<http://lattes.cnpq.br/9312013606004988>

Thiago Machado Pasin

Universidade de São Paulo
Ribeirão Preto-SP
<http://lattes.cnpq.br/6971486417398496>

Vivian Machado Benassi

Universidade Federal dos Vales do
Jequitinhonha e Mucuri campus JK
Instituto de Ciência e Tecnologia
Diamantina – MG
<http://lattes.cnpq.br/8244877867115110>

RESUMO: As enzimas são biocatalizadores, que auxiliam as células na realização de reações complexas, atuando na catálise e síntese de produtos em um menor tempo reacional. Elas agem tanto internamente quanto externamente nas células, sendo desnaturadas por variações

do meio de atuação, fatores relevantes para a tecnologia de alimentos. Sua importância dentro da indústria é baseada em sua viabilidade econômica, facilidade de obtenção, especificidade, e estabilidade durante o processamento, uma vez que sua aplicação aumenta a eficiência do processo e reduz custos quando comparadas com a utilização de agentes químicos. O valor economizado durante a produção irá refletir na redução do valor do produto final, o que é muito benéfico para o consumidor. É válido ressaltar que as enzimas também não oferecem risco à saúde, uma vez que são biomoléculas protéicas ou ribozimas, sendo obtidas a partir de diversas fontes: vegetal, animal e microbiana. As enzimas tem desempenhado um papel muito importante na indústria alimentícia, tais como nos setores de panificação, bolos e biscoitos; produtos lácteos; produção de edulcorantes; sucos de frutas e até mesmo queijos com aromas especiais, dentre outras aplicações. Devido à grande importância das enzimas e por agregar diversas vantagens para o setor industrial alimentício, faz-se necessário a realização de um levantamento bibliográfico acerca da aplicação dos biocatalisadores para um melhor entendimento sobre os processos industriais aplicados aos alimentos e o mecanismo de ação de algumas enzimas.

PALAVRAS-CHAVE: Enzimas. Indústria Alimentícia. Processos Industriais.

APPLICATION OF ENZYMES IN FOOD INDUSTRIES

ABSTRACT: Enzymes are biocatalysts that help

cells carry out complex reactions, acting on catalysis and synthesis of products in a shorter reaction time. They act both internally and externally in cells, being denatured by variations in the environment in which they action, relevant factors for food technology. Its importance within the industry is based on its economic feasibility, ease of obtaining, specificity, and stability during the process, since its application increases process efficiency and reduces costs when compared to the use of chemical agents. The value saved during the process will reflect the reduction in the value of the final product, which is very beneficial to the consumer. It is worth emphasizing that enzymes do not pose any health risk either, since they are protein or ribozymes, being obtained from different sources: plant, animal and microbial. Enzymes have played a very important role in the food industry, such as in the bakery, cakes and biscuits sectors; dairy products; production of sweeteners; fruit juices and even cheeses with special aromas, among other applications. Due to the great importance of enzymes and because they add several advantages for the industrial sector, it is necessary to carry out a literature review on the application of biocatalysts for a better understanding of industrial processes and the mechanism of action of some enzymes.

KEYWORDS: Enzymes. Food Industry. Industrial Processes.

1 | INTRODUÇÃO

Em todas as células vivas ocorrem reações que, considerando a sua complexidade, aconteceriam lentamente à temperatura ambiente. Na prática, essas reações ocorrem com muita rapidez devido ao auxílio de catalisadores biológicos presentes nas células vivas, que estão envolvidos em todos os processos bioquímicos (KIELING, 2002).

Esses catalisadores possuem características que despertam interesse nas indústrias, dentre elas a capacidade de decompor moléculas complexas em unidade menores, auxiliar na obtenção de moléculas específicas, catalisar modificações estruturais dentro de uma molécula e não oferecerem risco à saúde (MALLER, 2008; HARGER, 1982).

Há uma variedade de processos industriais onde podem ser aplicadas, podendo citar indústria alimentícia (panificação, bolos e biscoitos; produtos lácteos; produtos cárneos; cerveja; produção do açúcar; entre outras), têxtil, de biocombustíveis, de cosméticos, farmacêutica e na indústria de produtos voltados para o cuidado da casa.

Levando em consideração a grande importância das enzimas e sua vasta aplicabilidade, o presente trabalho realizou um estudo teórico acerca da atuação de diversas enzimas em distintos processos na indústria de alimentos.

2 | ENZIMAS

Há muitos anos, o homem explora involuntariamente as enzimas com o intuito de produzir alimentos ou até mesmo modificá-los, como por exemplo, fermentar uvas e fabricar o vinho, alterar o leite e produzir queijos, fazer pães, cerveja, tudo através da fermentação natural. Após os cientistas desvendarem a atuação das enzimas, estas passaram a ser

empregadas em maior escala nas mais variadas finalidades, não somente na área de alimentos, mas em vários outros setores (MUSSATO; FERNANDES; MILAGRES, 2007).

Através dos estudos acerca da digestão da carne por secreções do estômago, foi que a catálise biológica começou a ser descrita e reconhecida no século XVII. O cientista Von Liebig imaginou que a fermentação resultasse de um processo químico comum, no qual os fermentos eram considerados materiais não vivos (COX; NELSON, 2014).

Em estudos posteriores, os cientistas começaram a analisar a conversão do amido em açúcar pela saliva e a fermentação do açúcar em álcool. Louis Pasteur concluiu, em 1850, que a fermentação é catalisada por fermentos (enzimas) criando o postulado do vitalismo, ou seja, os fermentos não se separam da estrutura das células vivas do levedo. No ano de 1897, Eduard Buchner encerrou o postulado proposto por Pasteur e pode provar que a fermentação era realizada por moléculas que permaneciam ativas independentemente se estavam separadas das células ou não, originando a Enzimologia, o estudo dos agentes químicos responsáveis pela fermentação. Com essa descoberta foi laureado com o Prêmio Nobel de Química em 1907 (VENTURA; FREITAS; FREIRE, 2008; SILVA, 2013).

Frederick W. Kühne empregou, pela primeira vez, o termo enzimas, que do grego significa “na levedura” para descrever esses biocatalisadores. O que ainda intrigava os pesquisadores era a questão de não saberem ao certo sobre a natureza das enzimas, e para responder à essa incógnita, em 1926, James Sumner realizou um experimento com a urease, isolando esse biocatalisador e, em seguida, fazendo a cristalização. Após descobrir que os cristais de urease constituíam-se de proteínas, postulou que enzimas eram proteínas (COX; NELSON, 2014; MALLER, 2008).

O postulado de Sumner permaneceu como algo duvidoso por alguns anos, até que em 1930 John Northrop e Moses Kunitz descobriram que a pepsina, a tripsina e outras enzimas digestivas tratavam-se de proteínas, e aceitaram, então, a conclusão feita por Sumner. J. B. S. Haldane, supondo que as ligações fracas entre as enzimas e seu substrato tinham a possibilidade de serem utilizadas na catálise da reação. Depois disso, várias enzimas foram isoladas, purificadas e classificadas, e descobriram então, no final do século XX, a existência das ribozimas, RNA (ácido ribonucleico) com ação catalítica (COX; NELSON, 2014; MALLER, 2008).

Com tantas descobertas e contribuições desde os anos de 1700, a bioquímica e a biologia conseguiram compreender melhor sobre a estrutura e aplicação das enzimas e se esforçam para entender ainda mais, a nível atômico, como elas funcionam. Hoje em dia, as enzimas são aplicadas em diversas áreas do setor industrial. A demanda para aumentar a estabilidade, atividade e especificidade destas cresce rapidamente, e as pesquisas têm trazido grandes avanços que facilitam o desenvolvimento desses biocatalisadores.

As reações catalisadas por enzimas ocorrem no sítio ativo, ou centro ativo, sendo caracterizado por um bolsão da enzima composto por duas regiões, uma denominada de sítio de ligação, local de reconhecimento específico do substrato, e o sítio de catálise. As

enzimas possuem um alto grau de especificidade, uma dada enzima catalisa uma única reação das várias reações que um único substrato pode oferecer (REIS, 2016).

Esses catalisadores biológicos possuem suas nomenclaturas caracterizadas pela adição do sufixo “ase” ao nome dos seus substratos, a palavra ou frase que descreve sua atividade. Outras enzimas receberam o nome em relação a função ampla que a caracterizava, caso da pepsina, do grego pepsis (digestão), é uma enzima conhecida por atuar na digestão de alimentos (COX; NELSON, 2014).

Atualmente, bioquímicos adotaram um sistema de nomenclatura e classificação de enzimas. Assim, de acordo com a Comissão sobre Enzimas (E. C., do inglês Enzyme Commission) da União Internacional dos Bioquímicos (I.U.B.), as enzimas são divididas em 6 classes, cada uma com subclasses de acordo com os tipos de reações que catalisam. Com isso, elas possuem um nome sistemático e também um número de classificação de quatro dígitos para uma identificação mais precisa. O primeiro indica a reação que é catalisada, o segundo a função envolvida, o terceiro traz mais informações sobre a reação catalisada indicando um substrato ou um grupo receptor, e o quarto é o número de série da enzima em sua subclasse (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2007).

A maioria das enzimas sintetizadas nas células são intracelulares, porém existem também as enzimas extracelulares que são aquelas sintetizadas e excretadas para fora da célula viva, podendo ser facilmente encontradas e isoladas para análises no meio de cultivo ou de propagação celular (KIELING, 2002).

Tratando-se da indústria de alimentos, a aplicação da tecnologia enzimática para a redução de custos e melhoria da qualidade já é realidade no mundo inteiro, com grande possibilidade de expansão no Brasil, que dispõe de empresas de setores de ponta na produção alimentícia. Grande parte das enzimas preparadas em escala industrial são extracelulares, pelo fato do seu isolamento ser mais simples, conseqüentemente, menos oneroso (KIELING, 2002).

O uso de subprodutos agrícolas como farelo de algodão, casca da soja, soro do leite e farelo de trigo como fonte indutora da síntese de enzimas a partir de microrganismos possibilita a redução do custo de produção desses biocatalisadores no país, e tende a aumentar a utilização dos mesmos de forma geral, mas de maneira particular, nos processos industriais (MUSSATTO; FERNANDES; MILAGRES, 2007).

Nas aplicações industriais, as enzimas ideais precisam ser tolerantes a diversos fatores físico-químicos como pH, temperatura, íons metálicos, e apresentarem alta eficiência catalítica, e baixo custo de produção. O entendimento destas propriedades das enzimas é importante para otimizar e reduzir os custos do processo (KIELING, 2002).

Devido a dependência da conformação das proteínas, em parte, de suas cargas elétricas, haverá um pH no qual a conformação será a mais adequada para a atividade catalítica, sendo denominada de conformação nativa, cuja variação pode levar à desnaturação enzimática, perda da conformação tridimensional e retorno à estrutura

primária (KIELING, 2002).

O aumento da temperatura influi na atividade enzimática acelerando as reações catalíticas, entretanto, a partir de determinada temperatura as proteínas começam a se desnaturar devido ao calor excessivo e rompimentos das interações fracas que mantem a estrutura tridimensional da proteína. Todas as enzimas possuem uma faixa de temperatura onde observa-se um valor ótimo de atividade, acima da qual começa a diminuir até anular-se devido a desnaturação térmica (KIELING, 2002).

O mercado global de enzimas é movido pelo aumento da aplicabilidade das mesmas devido à necessidade das indústrias que precisam produzir produtos com normas ambientais rigorosas, coibindo o uso de produtos químicos. Esse mercado foi avaliado em US\$ 4,94 bilhões em 2015, com uma proposta de crescimento para 2021 ao ponto de atingir o valor de US\$ 6,99 bilhões (GLOBAL INDUSTRIAL ENZYMES, 2015).

As enzimas estão sendo bastante utilizadas em produtos farmacêuticos, biocombustíveis, alimentos processados, têxteis, processamento de papel, entre outros. Há duas classificações gerais do mercado global de enzimas industriais, sendo elas por aplicação e tipo. Por aplicação temos exemplos da utilização em laticínios, na produção de cervejas, produtos de limpeza como detergentes, cosméticos e até mesmo ração animal. A classificação por tipo de enzima engloba as amilases, lipases, celulasas, proteases, xilanases e várias outras (GLOBAL INDUSTRIAL ENZYMES, 2015).

Dentre as principais aplicações das enzimas no ramo alimentício, de uma forma geral, podemos citar os setores de amidos e açúcares; álcool e derivados; óleos e gorduras; panificação e biscoitaria; cervejaria; laticínios e derivados; suco de frutas (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2007).

Na Tabela 1 podem ser observados alguns exemplos de enzimas utilizadas na fabricação de alimentos.

Enzimas	Fonte	Ação nos alimentos	Aplicação nos alimentos
Amiloglucosidase	<i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus sp.</i>	Hidrólise de dextrina do amido em glicose.	Uma das fases da frutose para a produção de xarope de milho, produção de cervejas com maior vida útil.
Aminopeptidase	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus oryzae</i>	Libera aminoácidos livres a partir da extremidade N-terminal.	Proteína de amargor de hidrolisados, acelera a maturação do queijo.
Bromelina	Fruta e caule do abacaxi	Hidrólise de proteínas.	Tenderização de carne muscular e do tecido conjuntivo.
Catalase	<i>Aspergillus niger</i> <i>Micrococcus luteus</i>	Decompõe o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio.	Tecnologia de remoção de oxigênio, combinado com oxidase de glicose.
Celulase	<i>Aspergillus niger</i> <i>Trichoderma sp.</i>	Hidrólise da celulose.	Liquefação de frutas para a produção de sucos.
Ciclodextrina glicosiltransferase	<i>Bacillus sp.</i>	Sintetiza ciclodextrina a partir do amido liquefeito.	Ciclodextrinas são alimentos encapsulados e vitaminas.

Glicose isomerase	<i>Actinoplanes missouriensis</i> <i>Bacillus coagulans</i> <i>Streptomyces lividans</i>	Converte glicose em frutose.	Produção de xarope de milho com alto teor de frutose utilizado para adoçar bebidas.
Glicose oxidase	<i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium chrysogenum</i>	Oxida glicose em ácido glucônico.	Remoção de oxigênio de embalagens de alimentos, remoção da glicose a partir da clara de ovo para evitar o escurecimento.
Hemicelulases	<i>Aspergillus sp.</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Trichoderma reesei</i>	Hidrólise da hemicelulose.	Melhoria da estrutura do miolo do pão.
Lipase	Esôfago de caprinos e ovinos, abomaso de bezerro, pâncreas de suínos	Hidrólise de triglicerídeos.	Realça o sabor em queijos, modificação da gordura por interesterificação.
Lipase/esterase	<i>Aspergillus sp.</i> <i>Candida sp.</i> <i>Rhizomucor miehei</i> <i>Penicillium roqueforti</i>	Hidrólise de triglicerídeos em ácidos graxos e glicerol. Hidrólise de ésteres de alquila em ácidos graxos e álcool.	Realça o sabor em queijos, modificação da função de gorduras por interesterificação, síntese de ésteres de aromas.
Lisozima	Ovo de galinha	Hidrólise de polissacarídeos da parede celular bacteriana.	Prevenção de defeitos de sopro final em queijos por bactérias formadoras de esporos.
Papaína	<i>Látex dos frutos verdes de papaia</i>	Hidrólise de proteínas em alimentos e bebidas.	Tenderização de carnes, prevenção de névoa na cerveja.
Pepsina	Abomaso de bovinos	Hidrólise da kappa-caseína e da caseína geral de queijos.	Usualmente presente com quimosina como parte do coalho.
Poligalacturonase	<i>Aspergillus sp.</i> <i>Penicillium funiculosum</i>	Hidrólise da pectina.	Clarificação de sucos de frutas.
Protease	<i>Aspergillus sp.</i> <i>Penicillium citrinum</i> <i>Rhizopus niveus</i> <i>Bacillus sp.</i>	Hidrólise da kappa-caseína. Hidrólise de proteínas alimentícias animais e vegetais. Hidrólise do glúten do trigo.	Coagulação do leite para a fabricação de queijos, produção de hidrolisados para sopas e alimentos salgados, melhorar a massa do pão.
Quimosina	Abomaso de bezerro	Hidrólise da kappa-caseína.	Coagulação do leite para a fabricação de queijos.
Tripsina	Bovina e suína	Hidrólise da proteína dos alimentos.	Produção de hidrolisados de aromas alimentícios.
α -amilase	<i>Aspergillus sp.</i> <i>Bacillus sp.</i>	Hidrólise do amido do trigo.	Amolecimento da massa, aumento do volume do pão, auxilia na produção de açúcares para a fermentação.
β -amilase	Batata doce	Hidrólise do amido em maltose.	Produção de xaropes com alto teor de maltose.
β -galactosidase	<i>Aspergillus sp.</i>	Hidrólise da lactose do leite em glicose e galactose.	Adoçantes de leite e soro, produtos para pessoas com intolerância a lactose, redução da cristalização em sorvetes que contêm soro de leite, melhora a funcionalidade da proteína concentrada de soro, fabricação de lactulose.
β -glucanase	<i>Aspergillus sp.</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Hidrólise de β -glucanas.	Auxiliares de filtração, prevenção de névoa na produção de cervejas.

Tabela 1: Enzimas utilizadas na fabricação de alimentos.

Fonte: (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2007).

3 I APLICAÇÃO INDUSTRIAL DAS ENZIMAS

3.1 Panificação

A indústria de panificação é bastante diversificada e de acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Panificação (ABIP), cerca de 98% dos brasileiros consomem alimentos provenientes da mesma, sendo 86% produtos artesanais e destes, 52% equivalem ao consumo de pão francês (NITZKE; BIEDRZYCKI, 2004).

Devido ao alto consumo e o valor acessível, o segmento dos pães é uma ótima opção para a inserção de micronutrientes e fibras. Atualmente, existem legislações que obrigam que farinhas de trigo sejam enriquecidas, com ferro e ácido fólico, por exemplo, justamente para suprir a necessidade de tais nutrientes essenciais ao nosso organismo, em especial da população mais vulnerável e carente.

Neste segmento industrial, há problemas como o endurecimento de pães, perda de sabor e da firmeza (pão murcho), casca menos crocante, entre outros, sendo essas modificações decorrentes do armazenamento, e que podem ser retardadas com complementação com aditivos durante a produção. Visando um alimento mais natural e aceitável pelos consumidores, enzimas que atuam sobre o amido têm sido sugeridas como agentes antienvelhecimento (BENASSI, 2009).

Com o intuito de aprimorar a produção e melhorar a qualidade do produto final, utiliza-se enzimas amilolíticas, uma vez que elas atuam sobre as moléculas do amido influenciando de maneira positiva na maciez, volume, cor, sabor e textura do alimento, aumentando também a vida de prateleira (GUPTA et al., 2003).

As α -amilases, amilases maltogênicas, β -amilases e amiloglicosidades são exemplos de enzimas utilizadas na fabricação do pão juntamente aos outros componentes aumentando a velocidade de degradação da fonte de carbono e liberando o açúcar imediatamente assimilado à levedura, melhorando as características desejáveis (GUPTA et al., 2003; BENASSI, 2009).

Ao moer a matéria prima, os grânulos de amido podem sofrer alguns danos que interferem na absorção da massa e qualidade do pão. A atuação das amilases sobre o amido danificado ou gelatinizado evitam a produção de um miolo gosmento, retardando o envelhecimento precoce do pão, auxiliando na formação de uma crosta crocante, assegurando a quantidade suficiente de açúcares fermentescíveis presentes na massa, aumentando o poder fermentativo e, conseqüentemente, o volume dos pães.

A maciez e umidade do miolo, por sua vez, é resultado da aplicação de α -amilase maltogênica, que irá produzir maltodexinas que bloqueiam a interação entre o amido e o glúten, gerando um efeito anti-*staling*. Além disso, a produção de açúcares redutores favorecem a Reação de Maillard, o que contribui para uma melhor coloração da crosta e sabor do produto de forma a atrair mais o consumidor (NITZKE; BIEDRZYCKI, 2004).

A evolução das técnicas relacionadas à biotecnologia, como o uso de enzimas,

irão ajudar na redução dos custos de produção, estimulando ainda mais o consumo das mesmas pelas indústrias (POLITZER; BOM, 2006).

3.2 Clarificação de sucos de frutas

O Brasil é um dos maiores produtores de laranja (FAO, 2003), com isso, a produção de suco de laranja atinge uma relevância de grande impacto comercial, em escala mundial, seja ele concentrado, pasteurizado ou fresco.

Quando a indústria alimentícia começou a produzir sucos de frutas, em meados da década de 1930, a produção era baixa e encontrava muitas dificuldades para filtrar o suco e obter uma clarificação desejável. Desde então, são realizadas pesquisas que utilizam enzimas para o aprimoramento do processamento e clarificação dos sucos.

Pectinases derivadas de microrganismos, em especial o fungo *Aspergillus niger*, são utilizadas em escala industrial e possui especificidades como faixas de pH e temperatura ideais para seu melhor desempenho. O pH ideal das pectinases secretadas por fungos é próximo ao pH de muitos sucos de frutas, o que favorece sua aplicação (UENOJO; PASTORE, 2007).

A indústria de alimentos e bebidas é o segmento que mais utiliza as pectinases como fonte biotecnológica, em especial no mercado de sucos. Essas enzimas equivalem a aproximadamente 10% da produção total de enzimas no mundo (MUKESH et al., 2012).

A pectina está presente nas frutas, principalmente nas cítricas, sendo utilizada como agente gelificante na indústria de alimentos para a produção de geleias, porém é um agente indesejável quando se trata da produção de sucos. (NAZZARO et al., 2012).

Como exemplos de frutas que possuem uma concentração significativa de pectina temos o maracujá (15-40g/100g de matéria úmida), a laranja (4-30g/100g de matéria úmida), a maçã (0,5-1,5g/100g de matéria úmida), a uva (0,2-1g/100g de matéria úmida), o morango (0,7g/100g de matéria úmida) e o caqui (0,6g/100g de matéria úmida) (THAKUR et al., 1997; UHLIG, 1998; KAUR et al., 2004).

O processo de extração dos sucos inicia-se com a prensagem das frutas, o que resulta em um aumento das partículas em suspensão. A presença das substâncias pécticas nos sucos de frutas aumenta consideravelmente a viscosidade dos mesmos, aumentando a concentração e dificultando o processo de filtração durante a sua produção. A adição das pectinases irá facilitar tal processamento, visto que ela irá degradar a pectina e outros compostos de alto peso molecular, resultando na diminuição da viscosidade, aumento do rendimento, redução de até 50% do tempo de filtração e dando uma aparência cristalina ao produto final (UENOJO; PASTORE, 2007).

A reação que acontece para que haja uma diminuição rápida e acentuada da viscosidade da solução é a clivagem do polímero e liberação de oligossacarídeos. Com apenas 3% de quebra das ligações glicosídicas é possível reduzir em até 50% a viscosidade dos sucos de frutas (SANTI et al., 2014).

A utilização de pectinases associadas a outras enzimas, tais como as celulases e hemicelulases, são denominadas de enzimas de maceração, atuando no aumento do rendimento da extração de suco e melhora no processamento da matéria prima sem aumento de custos de produção (SANTI et al., 2014). Essas enzimas agem de forma combinada podendo ser aplicadas para macerar a polpa até a liquefação quase completa das frutas ou dos vegetais facilitando a extração de alguns compostos como a cor (UENOJO; PASTORE, 2007).

A produção de sucos à base de frutas e vegetais produz grande quantidade de resíduos agroindustriais, biomassa rica em pectina que pode ser empregada como substratos indutores para a produção de pectinases. Dessa forma, o custo de produção dessas enzimas é reduzido e, de certa forma, o processo pode se realimentado (KAUR et al., 2004).

Nesse caso, o Brasil não só atua como grande consumidor de tais enzimas, mas também ocupa uma posição estratégica como potencial e promissor produtor. Devido a atual importância comercial, bem como a diversidade de aplicação e potencial biotecnológico revelado por novas pesquisas, as pectinases se consolidam cada vez mais como uma das enzimas de maior relevância industrial nos mercados nacional e internacional (SANTI et al., 2014).

3.3 Formação de xiloligossacarídeos

Na atualidade há uma grande preocupação da população em consumir produtos que sejam benéficos à saúde com o intuito de melhorar a qualidade de vida. Com isso a demanda por alimentos saudáveis e de caloria controlada tem aumentado consideravelmente (MENEZES, 2008; CUNHA, 2016).

Inúmeros compostos alternativos tem surgido para suprir a necessidade do mercado inovador, destes, pode-se destacar os xilooligossacarídeos (XOS), que apresentam grande importância devido às suas atividades funcionais. Os XOS são definidos como açúcares não convencionais, não calóricos e não metabolizados, formados por duas a seis unidades de xilose unidos entre si por ligações β -1,4-xilosídicas proveniente da hidrólise da hemicelulose, abundante nas paredes celulares de grãos (KUMAR, SATYANARAYANA, 2011; SAMANTA et al., 2015).

Os XOS além de serem benéficos à saúde possuem a vantagem de serem obtidos através de fontes altamente disponíveis e de baixo custo, como os resíduos agroindustriais, uma das maiores fontes de biomassa do mundo. A geração de resíduo lignocelulósico (como bagaço de cana, palha de milho), equivale a 40 milhões de toneladas por ano, uma quantidade significativa que gera prejuízos tanto para o meio ambiente quanto para as atividades agroindustriais (CANO & PALET, 2007).

O mercado busca novas tecnologias aliadas ao baixo custo e alta produtividade do processo. Ultimamente, o potencial biotecnológico da xilana vem sendo destacado pelos

pesquisadores e a aplicação dessas enzimas têm crescido bastante na indústria alimentícia (LARA, 2013).

A xilanase atua no processo de hidrólise da xilana que é convertida em xilose ou xilooligossacarídeo, um método enzimático muito vantajoso pois não gera subprodutos indesejáveis e não necessita de equipamentos complexos (YANG et al., 2011; SAMANTA et al., 2015). Há então o desenvolvimento de bioprocessos econômicos usando enzimas xilanólíticas para produção de XOS. Diversos microrganismos chamados de produtores de xilanases são aplicados no desenvolvimento de novos processos (MEYER et al., 2015).

Os XOS são utilizados, principalmente como, prebióticos, edulcorantes ou aditivos em alimentos (LACHKE, 2006), caracterizando-se como prebióticos por promoverem seletivamente o crescimento de probióticos como os *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium bifidum* no trato digestivo (GIBSON, 2004), agregando efeitos benéficos à saúde humana, tais como a redução da constipação intestinal, promoção da digestão e absorção de nutrientes como o cálcio, prevenção de infecções gastrintestinais, inibição do crescimento de microrganismos patogênicos, diminuição dos níveis séricos de colesterol total e de lipídeos (MENEZES, 2008; YANG et al., 2011).

A D-xilose, um monômero obtido a partir da hidrólise completa da xilana, é usada por microrganismos para produzir o xilitol, aplicado na indústria de alimentos como adoçante natural, utilizado para substituir o açúcar na alimentação dos diabéticos (PARAJÓ et al., 1998, Yang et al., 2005).

Nos últimos anos, devido ao aumento do custo de matérias-primas tradicionais e a busca por outros ingredientes alternativos, a indústria tem recorrido ao uso das xilanases em alimentos, em decorrência das suas potenciais aplicações em vários processos industriais.

3.4 Produtos zero lactose

A lactose é um carboidrato presente no leite produzido por mamíferos e nosso organismo fabrica uma enzima que degrada este açúcar denominada de β -galactosidase, popularmente conhecida como lactase.

Uma falha na produção endógena da enzima β -galactosidase por alguns indivíduos, afetada por fatores genéticos, pode gerar dificuldades na degradação da lactose, doença conhecida como intolerância à lactose, sendo que em alguns casos os indivíduos acabam perdendo a capacidade de digerir a lactose, causando desconforto intestinal, flatulência, cólicas, diarreia entre outros. Sabe-se que na atualidade, aproximadamente 70% da população mundial apresenta algum nível de dificuldade na digestão de lactose (MONTANHINI, 2020).

Devido a essa deficiência e a demanda de pessoas intolerantes que desejam consumir produtos que contenham lactose, a indústria de alimentos busca alternativas como a adição da enzima lactase para oferecer a eles produtos com teor reduzido de lactose ou zero lactose. Esta tecnologia é embasada na capacidade da enzima lactase

hidrolisar o dissacarídeo visto que esta ação não ocorrerá nesse grupo específico de consumidores (GODOY, 2016).

O leite *in natura* contém, em média, um teor de 4,7% de lactose, podendo reduzir para 0,1% com a adição da β -galactosidase. Considera-se um produto isento de lactose aquele que apresentar a quantidade inferior a 100 mg de lactose por 100 g ou 100 mL. A RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) 135 e 136 determina que o alimento que contém a quantidade acima de 0,1% de lactose precisa deixar evidente em seu rótulo a expressão “contém lactose” (ANVISA, 2017; MONTANHINI, 2020).

Leite em pó, iogurtes, bebidas lácteas, creme de leite, leite condensado, doce de leite e queijos frescos e requeijão são exemplos de produtos que já são produzidos com a tecnologia zero lactose.

A hidrólise enzimática, catalisada pela lactase, quebra o carboidrato em dois monossacarídeos, a glicose e a galactose que são facilmente absorvidos pelo organismo. O grau de hidrólise depende da dosagem da enzima e as condições de processamento (MONTANHINI, 2020).

A obtenção da enzima de fontes como os microrganismos é uma tendência, e tal procedência irá interferir diretamente nas suas propriedades, como temperatura e pH ideal, atividade enzimática e massa molecular. As lactases obtidas de fungos filamentosos, como *Aspergillus niger*, despertam muito interesse na indústria, uma vez que eles apresentam boa atividade em altas temperatura e em pH baixo (GODOY, 2016).

De acordo com Montanhini (2020), o emprego de lactase para a hidrólise da lactose em produtos alimentícios vem crescendo, e é um método que não se limita ao mercado de produtos zero lactose. A enzima auxilia também evitando a cristalização de doces de leite, sorvetes e leite condensado; assim como a glicose e galactose formados pela hidrólise da lactose aumenta o poder edulcorante dos produtos, pois os monossacarídeos possuem um índice de dulçor superior ao da lactose; e ajudam na redução calórica a partir da diminuição de açúcares adicionados.

3.5 Queijos enzimaticamente modificados

O aroma é um dos principais aditivos aplicado na indústria alimentícia e tradicionalmente sua obtenção é realizada através de óleos essenciais de plantas ou através da síntese orgânica, sendo que esta última produz aromas nomeados como artificiais e, atualmente, são utilizados quando não há uma fonte natural para a síntese (OLIVEIRA, 2010).

Recentemente, a busca por um estilo de vida saudável tem aumentado bastante, fazendo com que as pessoas busquem consumir alimentos, ingredientes, aditivos naturais e que de preferência agreguem valor à saúde. Com isso, novos estudos sobre a biotecnologia de fungos e a tecnologia enzimática proporcionaram um aumento significativo na aplicação destes para a obtenção de aromas naturais (CHIAPPINI, 2008).

As lipases são responsáveis, na indústria de alimentos, pela formação de propriedades desejáveis, como o sabor característico de alguns queijos maturados do tipo Roquefort, Camembert, e vários queijos italianos. Esta aplicação tem relação com a atividade de hidrólise, sendo que a posição, o tamanho da cadeia e o grau de insaturação dos ácidos graxos liberados influenciam nas propriedades físicas e no valor sensorial de um triglicerídeo (JAEGER; REETZ, 1998).

Não há diferença química entre aromas sintetizados naturalmente ou os mesmos compostos orgânicos sintéticos. No entanto, a ideia de que qualquer substância natural nos traz benefícios e que as sintéticas são nocivas ainda é comum entre os consumidores. Esse foi um dos fatores relevantes para a aplicação das enzimas com função de intensificar o aroma do queijo, sendo esta uma alternativa promissora (OLIVEIRA, 2010).

Uma vez que as enzimas são capazes de modificar um substrato levando à síntese de aromas, por isso são consideradas catalisadores excelentes no preparo de enantiômeros puros em aromas e fragrâncias, ao passo que os métodos químicos normalmente tendem a formar misturas de isômeros (FRANSSEN et al., 2005).

A fermentação é um processo de grande importância para a produção de queijos com o benefício de fornecer uma diversidade de aroma ao produto. O aroma é resultado da atividade enzimática residual, essencial para o desenvolvimento do mesmo em queijos maturados (REINECCIUS, 2006).

A formulação do aroma de queijos inclui compostos como álcoois, aldeídos, ésteres, ácidos orgânicos de cadeias médias e curtas, metilcetonas, lactonas, compostos fenólicos e compostos sulfurados. Os compostos envolvidos no aroma e no sabor de vários queijos são derivados de três grandes vias metabólicas: o catabolismo de proteínas, de lactose e de lipídios (MOLIMARD; SPINLER, 1996).

A formação de ácidos graxos principalmente de cadeia curta provenientes da hidrólise da gordura do leite, ocasionada pelas lipases, são os componentes chaves na formação de aroma de queijo (McSWEENEY; SOUSA, 2000).

Para a produção de queijo enzimaticamente modificado é necessária a escolha de enzimas apropriadas e sua aplicação sob condições ótimas de temperatura. A maioria das lipases microbianas apresentam especificidade pela posição 1 ou 3 do triglicerídeo, onde os ácidos de cadeia curta são encontrados. O perfil ou a intensidade do aroma é proporcional ao grau de lipólise e liberação de ácidos de baixa massa molecular (OLIVEIRA, 2010).

O queijo modificado por ação das enzimas geralmente é feito a partir de pasta de queijos da mesma qualidade que se deseja obter. Essa pasta contendo a enzima passa pelo processo de incubação, sendo que o binômio tempo e temperatura de incubação vão influenciar na ação da enzima e devem ser cuidadosamente controlados. Ao final desse processo, a enzima precisa ser inativada para parar a reação e garantir a estabilidade do aroma (KILCAWLEY, 1998).

A utilização de queijo enzimaticamente modificado pode acarretar em uma economia

nos custos de matéria-prima, na formulação de alguns produtos, chegando a atingir uma porcentagem econômica superior a 50% da quantidade de queijo natural, isso com a substituição por uma pequena quantidade do queijo natural pelo queijo enzimaticamente modificado (KILCAWLEY, 1998).

4 | CONCLUSÃO

A alta aplicabilidade das enzimas permite utilizá-las em diversos processos industriais alimentícios. Através do controle das enzimas pode-se interferir desde a matéria-prima, a colheita, o armazenamento e no processamento de diversos produtos. Estima-se o desenvolvimento no mercado global das enzimas industriais e a inovação de novos produtos para serem explorados e oferecer melhoria e oportunidades para o surgimento de produtos com alta qualidade.

A importância das enzimas no processamento dos alimentos se dá pela representatividade econômica da mesma, visto que sua aplicação aumenta a eficiência do processo e reduz custos quando comparadas com a utilização de catalisadores químicos. O valor economizado durante o processo irá refletir na redução do valor do produto final, o que é muito benéfico para o consumidor, além da melhoria das qualidades do produto final.

Muitos estudos têm sido feitos com o intuito de compreender o isolamento, seleção, produção, caracterização e aplicações das enzimas, não somente em processamento de alimentos, mas também para outras aplicações industriais. A importância biotecnológica de microrganismos e de suas enzimas desperta bastante interesse nos pesquisadores e empreendedores de modo geral.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), CAPES, FAPEMIG, CNPq.

REFERÊNCIAS

ADITIVOS E INGREDIENTES. **Função e Aplicação das Enzimas na Indústria Alimentícia**, p. 39-50. 2007.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada- RDC Nº 135 e 136, de 08 de fev. de 2017**. Disponível em:< <https://ovigilantesanitario.files.wordpress.com/2017/02/rdc-135-e-136-lactose.pdf> > Acessado em: 15 de set. 2021.

CANO, A.; PALET, C. **Xylooligosaccharide recovery from agricultural biomass waste treatment with enzymatic polymeric membranes and characterization of products with MALDI-TOF-MS**. Journal of Membrane Science, v.291, p.96-105, 2007.

CHIAPPINI, C. C. de J. **Aromas naturais produzidos por microrganismos**. Food Ingredients Brazil, São Paulo, v. 10, 2008. P. 22. 2008.

COX, M. M; NELSON, D. L. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Dados eletrônicos. Editora Artmed. p. 189, 2014.

CUNHA, L. L. **Purificação e Caracterização Bioquímica e Biofísica de uma Xilanase de Aspergillus Foetidus**. 2016. Dissertação de Mestrado. Ciências Farmacêuticas - Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. 2003. **Medium-term prospects for agricultural commodities: projections to the year 2010**. Disponível em <<http://www.fao.org/docrep/006/y5143e/y5143e12.htm>> Acesso em: 14 de maio de 2021.

FRANSSSEN, M. C. R.; ALESSANDRINI, L.; TERRANEO, G. **Biocatalytic production of flavors and fragrances**. Pure and Applied Chemistry, v. 77, n. 1, p. 273-279, 2005.

GIBSON, G. R. **Prebiotics**. Best Pract Res Clin Gast, v. 18, p.287-298, 2004.

GLOBAL INDUSTRIAL ENZYMES. **Global Industrial Enzymes Market (2016-2021)**. Mordor Intelligence. 2015.

GODOY, G. G. **Estudo da Produção de Lactase por Fungos Filamentosos**. Trabalho de Conclusão de Curso- Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena-SP. 2016.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K. & CHAUHAN, B. **Microbiol α -amylases: a biotechnological perspective**. Process Biochem. 38: 1599-1616, 2003.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. **Microbial lipases form versatile tools for biotechnology**. Trends in Biotechnology, v. 16, p. 396-403. 1998.

KAUR, G.; KUMAR, S.; SATYANARAYANA, T. **Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould Sporotrichum thermophile Apinis**. Bioresource Technology, v. 94, p. 239-243, 2004.

KIELING, D. D. **Enzimas, aspectos gerais**. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

KILCAWLEY; K. N., 1998. In: REINECCIUS, G. **Flavor chemistry and technology**. Flavoring Materials Made by Processing – Enzyme-Modified Cheese (EMC). 2nd ed. Florida: Taylor & Francis Group, 2006. p. 279-282. 1998.

KUMAR, V.; SATYANARAYANA, T. **Applicability of thermo-alkali-stable and cellulase-free xylanase from a novel thermo-halo-alkaliphilic Bacillus halodurans in producing xylooligosaccharides**. Biotechnology letters, v. 33, n. 11, p. 2279-2285, 2011.

LACHKE, A. **Xylitol: a sweetener with special qualities**. Resonance. v.11, p. 90-92, 2006.

LARA, C. A. **Xilanases de leveduras e fungos leveduriformes e sua aplicação em processos de produção de bioetanol lignocelulósico e panificação.** Tese de Doutorado. Escola de Farmácia Departamento de Alimentos - Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, MG. 2013.

MALLER, A. **Produção, Purificação e Caracterização do Complexo Pectinolítico do Fungo *Aspergillus niveus*.** 2008. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

McSWEENEY, P. L. H.; SOUSA, M. J. **Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review.** *Le Lait*, v. 80, p. 293-324, 2000.

MENEZES, C. R.; DURRANTLL, L. R. **Xilooligossacarídeos: produção, aplicações e efeitos na saúde humana.** *Revisão Bibliográfica*, v.38, n.2, p.587-592. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, SP. 2008.

MEYER, T. et al. **Biotechnological Production of Oligosaccharides—Applications in the Food Industry.** In: EISSA, P. A. A. (Ed.). *Agricultural and Biological Sciences - Food Production and Industry.* Food Production and Industry, 2015.

MONTANHINI, M. T. M. **Utilização de Lactase na Indústria de Laticínios.** LC Bolonha Ingredientes. 2020. Disponível em:< <https://www.lcbolonha.com.br/2017/11/01/lactase-na-industria-de-laticinios/>> Acesso em 03 de jun de 2021.

MOLIMARD; SPINNLER, 1996

MUSSATO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. **Enzimas, uma ferramenta poderosa na indústria.** Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. *Ciência Hoje*, v. 41, p. 28-33, 2007.

MUKESH, K. D. J. et al. **Production and Optimization of Pectinase from *Bacillus sp.* MFW7 using Cassava Waste.** *Asian Journal of Plant Science and Research*, v. 2, n. 3, p. 369-375, 2012.

NAZZARO, F. et al. **Biochemical Traits, Survival and Biological Properties of the Probiotic *Lactobacillus plantarum* Grown in the Presence of Prebiotic Inulin and Pectin as Energy Source.** *Pharmaceuticals (Basel)*, v. 5, n. 5, p. 481-492, 2012.

NITZKE, J. A.; BIEDRZYCKI, A. **Como Fazer Pão.** Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos-UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.2004. Disponível em:< https://www.ufrgs.br/alimentos1/pao/ingredientes/ing_enzimas.htm> Acesso em 15 de set. de 2021.

OLIVEIRA, F. C. **Produção de lipase por *Penicillium roqueforti* e sua aplicação na obtenção de aroma de queijo.** 2010. 124 p. Dissertação de Mestrado em Ciências – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2010.

PARAJÓ, J. C.; DOMINGUES, H.; DOMINGUES, J. M. **Biotechnological production of xylitol.** Part 1: interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. *Biores Technol* 65:191–201, 1998.

POLITZER, K.; BOM, E. P. S. **Enzimas Industriais e Especiais. Termo de Referência Fórum de Biotecnologia.** 2006. Centro de Gestão e Recursos Estratégicos. Rio de Janeiro. 2006.

REINECCIUS, G. **Flavor Chemistry and Technology**. 2nd ed. New York: CRC Press, p. 489. 2006.

REIS, A. G. R. **Estudo do mecanismo de inibição da enzima diidroorotato desidrogenase de Leishmania major**. 2016. 184f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

REINECCIUS, 2006

SAMANTA, A. et al. **Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications**. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, v. 5, n. 1, p. 62-71, 2015.

SANTI, L.; BERGER, M.; SILVA, W. O. B. **Pectinases e Pectina: Aplicação Comercial e Potencial Biotecnológico**. *Caderno pedagógico, Lajeado*, v. 11, n. 1, p. 130-139, 2014.

SILVA, E. T. **Estabilização de Proteases para Aplicação Tecnológica**. Dissertação de Mestrado. Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2013.

THAKUR, B.R.; SINGH, R.K.; HANDA, A.K. **Chemistry and uses of pectin – a review**. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 37, p. 47-73, 1997.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. **Pectinases: aplicações industriais e perspectivas**. Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP. *Review*, v. 30, p. 388-394. 2007

UHLIG, G. **Industrial enzymes and their applications**. New York: John Wiley & Sons Inc., 1998, 472p. ISBN: 978-0-471-19660-0. 1998.

VENTURA, M. M.; FREITAS, S. M.; FREIRE, A. P. **Catálise enzimática – alguns destaques na evolução da enzimologia In: E. P. S. Enzimas em biotecnologia – Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, cap. 1, p. 1-27, 2008.

YANG, R.; XU, S.; WANG, Z.; YANG W. **Aqueous extraction of corncob xylan and production of xylooligosaccharides**. *LWT- Food Sci Technol*. v.38, p.677-82, 2005.

YANG, H. et al. **Production of xylooligosaccharides by xylanase from Pichia stipitis based on xylan preparation from triploid Populus tomentosa**. *Bioresource technology*, v. 102, n. 14, p. 7171-7176, 2011.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EXTRATO DA CASCA E POLPA DO TUCUMÃ (*Astrocaryum aculeatum*) FRENTE A BACTÉRIAS PATOGENICAS

Data de aceite: 01/11/2021

Maria Lucidalva Ribeiro de Sousa

Universidade Federal do Amazonas
Campus Manaus
Manaus-Amazonas
<http://lattes.cnpq.br/0537904542958586>

Isabela Ribeiro de Albuquerque

Universidade Federal do Amazonas
Campus Manaus
Manaus-Amazonas
<http://lattes.cnpq.br/5809269430664505>

Luana Priscilla Roque Moura

Universidade Federal do Amazonas
Campus Manaus
Manaus-Amazonas
<http://lattes.cnpq.br/5803891252682779>

Bruna Silva da Rocha

Universidade Federal do Amazonas
Campus Manaus
Manaus-Amazonas
<http://lattes.cnpq.br/4370998953418048>

Kelly Cristina da Silva Martins

Universidade Federal do Amazonas
Campus Manaus
Manaus-Amazonas
<http://lattes.cnpq.br/9871152352695908>

Janaína da Costa Nogueira

Universidade Federal do Amazonas
Campus Manaus
Manaus-Amazonas
<http://lattes.cnpq.br/0479858840376122>

Adriana Dantas Gonzaga de Freitas

Universidade Federal do Amazonas
Campus Manaus
Manaus-Amazonas
<http://lattes.cnpq.br/3694117633635449>

RESUMO: Os extratos vegetais representam atualmente uma fonte detentora de novos compostos com atividade antimicrobiana, capaz de fornecer novos medicamentos no combate de bactérias causadoras de doenças, sendo menos tóxicos são eficazes em não causar certos efeitos colaterais e, deve-se ao fato de gerar novos compostos, os quais os patógenos não se tornaram capazes de inativar, e por serem degradados rapidamente pelo ambiente, e possuírem um amplo modo de ação e derivados de recursos renováveis. Portanto, este trabalho investigou a atividade antibacteriana do extrato metanólico da casca do tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) contra 4 microrganismos: *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Realizou-se a partir dos processos estático, ultrassom e soxhlet, a extração dos compostos orgânicos. Os extratos obtidos foram testados quanto ao seu efeito antibacteriano pelo método de disco de fusão com quatro repetições por concentração, as concentrações (mg/mL) utilizadas foram: C1 (0,010), C2 (0,015), C3 (0,020) e C4 (0,050) para cada extrato e observada por 72h, quando presentes, os halos foram medidos e retirados uma média para realização do teste estatístico de Turkey a 5% de significância. Os resultados mostraram efeito antibacteriano para o extrato

com a casca do tucumã, e com melhor atividade foram os extratos com os métodos estático com 8,32 e ultrassom 8,66 mm na média, tendo um bom desenvolvimento contra as linhagens testadas de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *K. pneumoniae*. diferindo dos testes com o método soxhlet. No presente estudo foi encontrado atividade antibacteriana nos extratos metanólicos com a casca do tucumã para as concentrações testadas, entretanto, são necessários estudos com variadas frações destes, considerando o baixo custo e facilidade na aquisição das plantas.

PALAVRAS-CHAVE: *Astrocaryum aculeatum*, extrato metanólicos, tucumã, bactérias.

IN VITRO EVALUATION OF THE PEEL AND PULP EXTRACT OF TUCUMÃ (*Astrocaryum aculeatum*) AGAINST PATHOGENIC BACTÉRIA

ABSTRACT: Plant extracts currently represent a detaining source of new compounds with antimicrobial activity, able to provide new drugs to fight disease-causing bacteria, being less toxic, they are effective in not causing certain side effects and due to the fact that they generate new compounds, which the pathogens have not become able to inactivate, and because they are rapidly degraded by the environment, and have a broad mode of action and derivatives of renewable resources. Therefore, this work investigated the antibacterial activity of methanol extract of tucumã bark (*Astrocaryum aculeatum*) against 4 microorganisms: *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. The extraction of organic compounds was carried out using static, ultrasound and soxhlet processes. The extracts obtained were tested for their antibacterial effect by the fusion disk method with four repetitions per concentration, the concentrations (mg/mL) used were: C1 (0.010), C2 (0.015), C3 (0.020) and C4 (0.050) for each extract and observed for 72h, when present, the halos were measured and an average was taken to perform the Turkey statistical test at 5% significance. The results showed an antibacterial effect for the extract with tucumã bark, and with better activity were the extracts with the static methods with 8.32 mm and ultrasound 8.66 mm on average, having a good development against the tested strains of *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *K. pneumoniae*. Differing from tests with the soxhlet method. In the present study, antibacterial activity was found in methanol extracts with tucumã bark at the concentrations tested, however, studies are needed with different fractions of these, considering the low cost and ease of acquiring the plants.

KEYWORDS: *Astrocaryum aculeatum*, methanol extracts, tucumã, bacteria.

INTRODUÇÃO

Tendo uma variedade de compostos presentes nas plantas e frutos, como os polifenóis, são descritos como capazes de matar ou inibir o crescimento de microrganismos. Essas características são relevantes, principalmente em áreas tropicais, como a região amazônica, onde as condições climáticas propiciam o maior crescimento dos microrganismos (JOBIM et al.,2014)

O gênero *Astrocaryum* está amplamente distribuído na América do Sul. No Brasil, o gênero está distribuído geograficamente com ocorrência confirmada na região Norte, nos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, e Tocantins, na região

Nordeste nos estados da Bahia, Maranhão e Piauí (FLORA DO BRASIL 2020).

Assim sendo, o tucumã é um fruto rico em caroteno, proteínas, carboidratos, minerais e fibras é uma espécie que apresenta frutos consumidos na alimentação humana em grande quantidade na Amazônia que apresenta frutos com peso médio de 50,8 g, apenas 21,2 g são constituídos de mesocarpo (polpa), e o restante é tratado como resíduo (MARINHO E CASTRO, 2002), sendo que a quantidade de cascas e sementes que são descartadas do tucumã constitui mais de 50% do fruto. Esses subprodutos podem proporcionar outra fonte de valor à indústria de processamento uma vez que são geralmente descartados em grandes quantidades. Dessa forma, agregar valor a estes subprodutos é de interesse econômico e ambiental, sendo necessárias investigações científicas e tecnológicas que possibilitem sua utilização (SENA E NUNES, 2006; MARTINS E FARIAS, 2002).

Propriedades antimicrobianas oriundas do tucumã são relatadas por JOBIM et al, (2014) provavelmente, o efeito antibacteriano do fruto está associado à sua composição química, que inclui vários tipos de moléculas como polifenóis, pois os polifenóis são metabólitos secundários produzidos por plantas superiores que apresentam propriedades antibacterianas, antivirais e antifúngicas.

Nesse contexto, o estudo da composição química dos resíduos de *A. aculeatum*, aliada à avaliação de algumas atividades biológicas, poderia ser utilizado para uma possível utilização biotecnológica através da utilização dos extratos vindo da casca.

As plantas e frutos são fontes de vários produtos biológicos ativos, que dão origem a vários fármacos comerciais, com crescente interesse de pesquisadores quanto à diversidade de propriedades físico-químicas contidas em grupos de plantas ou parte delas, pouco estudados e com desconhecido potencial de metabólitos na maioria das espécies (ROZZATO, 2012).

Contudo, produtos naturais representam atualmente uma fonte detentora de novos compostos com atividade antimicrobiana, capaz de fornecer novos medicamentos no combate de bactérias causadoras de doenças (MAIA, 2015).

Desse modo, este trabalho é justificado pela necessidade de realizar mais pesquisas com extratos vegetais para o controle dos microrganismos patogênicos resistentes aos antibióticos atuais, e tem como objetivo investigar o potencial de ação antibacteriana dos extratos metanólicos, utilizando o método ultrassom, estático e soxhlet através da casca do fruto *Astrocaryum aculeatum* (tucumã) em frente à inoculação das cepas bacterianas de *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, em condições experimentais.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de Pesquisa

O trabalho foi realizado no Laboratório de Pesquisas em Microbiologia, no prédio 1 do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), localizado na Universidade Federal do Amazonas

Processamento e obtenção do material vegetal

As cascas do tucumã, foi doado por um micro empresa de despolpadores do fruto de Tucumã com a localização 3°05'17.2"S 59°58'44.5"W, em seguida foi identificado quanto à confirmação de gêneros e espécie no Laboratório de Botânica da Universidade federal do Amazonas (UFAM). Sendo pesadas, após esse processo, foram direcionada a estufa de circulação de ar e mantida a temperatura de 55 °C, por 6 a 7 dias. Após o período de secagem, as cascas foram trituradas com auxílio de um liquidificador, obtendo 150g do material triturado.

Preparação dos Extratos

Para a obtenção dos extratos metanolicos foram utilizados três métodos: Soxhlet, Ultrassom e Estático, para os três métodos foram utilizadas a medida de 50 g das cascas triturada do tucumã e 500 ml de álcool metílico. Os métodos Soxhlet e Ultrassom foram produzidos no Laboratório de Abertura de Amostra e Ensaio Químicos (LAEQ) no Instituto de Ciências Exatas na UFAM, e o método Estático no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia. Posteriormente os extratos foram rotaevaporados e encaminhados para capela de exaustão para a total evaporação do solvente no LAEQ.

Microrganismos utilizados

Para as realizações dos ensaios de atividade antibacteriana foram selecionadas as bactérias, de padrões internacionais (ATCC- American Type Culture Colletion) do Instituto Leônidas e Maria Deane-FIOCRUZ, sendo elas: *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) *S. aureus* (ATCC25923) e *K. pneumoniae* (ATCC 13899), onde foram mantidas no meio de cultura Agar Muller-Hinton (MH) até o teste ser iniciado.

Preparo do inóculo microbiano

Para os testes de difusão em ágar as bactérias foram inoculadas em tubos de ensaios contendo 5mL de meio MH para cada uma das cepas, onde cresceram em caldo por 24h, em seguida, foram colocadas em meio de cultura ágar Muller-Hinton (MH) e encubado por 24h. Posteriormente, para o inóculo as colônias obtidas em ágar MH, foram utilizadas na obtenção de uma suspensão bacteriana por sua densidade celular padronizada pela turbidez ajustada conforme a escala 0,5 de McFarland.

Avaliação da atividade antibacteriana

Para a avaliação da atividade antibacteriana, foram utilizadas 4 cepas bacterianas

selecionadas, sendo elas: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *K. pneumoniae*, as bactérias foram reativadas em caldo Muller-Hinton (MH) e em seguida espalhadas em placas Petri contendo meio de cultura Ágar Muller-Hinton (MH), em quatro repetições, cada qual contendo 4 discos com diferentes concentrações mg/mL: C1 (0,010), C2 (0,015), C3 (0,020) e C4 (0,050) no papel filtro com 0,5 milímetros cada, todos foram embebidos com os extratos metanólicos de tucumã casca provenientes dos processos de Soxhlet, Ultrassom e Estático, tendo ainda os outros dois com Dimetilsulfóxido (DMSO) controle negativo e antibiótico (tetraciclina) com C= (10 μ L + 1 mL de DMSO) controle positivo. os discos foram posicionados mantendo-se uma distância razoável entre si para evitar interferências entre os possíveis halos de inibição.

As placas foram incubadas a 35°C em câmaras climatizadas B.O.D (Biological Oxygen Demand) por 72h, durante os quais foram observados o desenvolvimento dos microrganismos e o surgimento dos halos.

Avaliações das atividades antimicrobianas do extrato

Para avaliação do experimento foi utilizada um paquímetro para medição dos halos de inibição, a leitura foi realizada durante três dias, ao final do terceiro dia os valores obtidos e somados para retirar as médias precisamente.

Análise Estatística

Os experimentos foram feitos em quatro repetições por concentração, para a comparação de crescimento dos valores a partir de cada concentração, e os dados foram analisados através de Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey a 5% de significância. Para análise dos dados foi utilizado o programa com o software Sisvar, versão 5.6, segundo as recomendações de FERREIRA (2014). E feito a partir do Excel® as tabelas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação das atividades do extrato

Observou-se nos bioensaios realizados no laboratório de Microbiologia- UFAM que os extratos metanólicos estático, ultrassom e soxhlet do tucumã (casca) foram avaliados em relação a sua atividade antibacteriana através de difusão de discos e observados em 3 dias, utilizando-se os microrganismos *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *K. pneumoniae*. Para o teste com o estático (Tabela 1), observou-se inibição em todas as concentrações para o extrato com a casca do tucumã, chegando a ficar na C4 (0,050) mg/mL, onde o extrato foi eficiente contra todas as bactérias inibindo o crescimento de todas as bactérias, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, e *K. pneumoniae*. Diferindo significativamente nas bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa* com média nos halos de 8,32 e 8,00 mm, das outras cepas.

As cascas do tucumã por ser considerada resíduos, o lixo é o seu destino final, sendo

uma fonte rica de metabolitos secundários e de fácil acesso para ser utilizado em largas escalas em estudo. Apesar do mercado brasileiro ser considerado pouco representativo, revela grande potencial, uma vez que, é um país agrícola, que gera grandes volumes de resíduos agroindustriais. Logo, a redução nos custos de produção de extratos, enzimas e outros através da utilização dos subprodutos agrícolas gerado como matéria-prima, conforme mostra na sua pesquisa DEWAN (2017).

Cepa	Tratamento/Estático	C1 0,010	C2 0,015	C3 0,020	C4 0,050
<i>S. aureus</i>	C. tucumã	5,50 b	6,33 b	7,31 b	8,32 c
<i>E. coli</i>	C. tucumã	4,00 c	5,22 b	6,33 c	7,51 c
<i>P. aeruginosa</i>	C. tucumã	4,01 b	5,00 b	6,01 b	8,00 b
<i>K. pneumoniae</i>	C. tucumã	3,00 a	4,00 a	5,20 a	6,58 a

Médias seguidas pela mesma letra para cada bactéria não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.
C= concentração/ mg/mL

Tabela 1- Médias dos halos (mm) a partir das concentrações com as cascas do tucumã, utilizando o método Estático.

Jobim et al, (2014), avaliaram a atividade antimicrobiana de extrato etanolico da casca e polpa da espécie *A. aculeatum*, com 37 microrganismos, onde observaram a atividade antimicrobiana. Os resultados apresentaram atividade bactericida significativa contra três importantes bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis*; *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*) e atividade antifúngica contra *Candida albicans*, sugerindo que o mecanismo de ação antimicrobiana do tucumã deve envolver um desequilíbrio que interfere o crescimento ou até a mortalidade do microrganismo.

Para o extrato (Tabela 2) com o Ultrassom obtiveram a média diferindo significativamente, pois teve resultado promissor em todas as concentrações e assim inibindo o crescimento antibacteriano da *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, e *K. pneumoniae*, respectivamente, sendo o melhor desempenho de média na concentração C4 (0,050) mg/mL, com a cepa *S. aureus* com 8,66 mm na média diferindo das outras bactérias.

Cepa	Tratamento/Ultrassom	C1 0,10	C2 0,015	C3 0,020	C4 0,050
<i>S. aureus</i>	C. tucumã	5,00 c	6,00 c	7,81 c	8,66 c
<i>E. coli</i>	C. tucumã	6,00 b	6,22 b	6,77 b	7,21 b
<i>P. aeruginosa</i>	C. tucumã	5,01 b	6,00 b	6,65 b	7,05 b
<i>K. pneumoniae</i>	C. tucumã	5,00 a	5,70 a	6,00 a	6,30 a

Médias seguidas pela mesma letra para cada bactéria não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.
C= concentração/ mg/mL

Tabela 2- Médias dos halos (mm) a partir das concentrações, utilizando o método Ultrassom.

O teste antimicrobiano avaliado a partir da casca do tucumã e feito pelo método do soxhlet (Tabela 3), não foi muito promissor no crescimento de halos em relação as bactérias observadas, obtendo uma diferença no crescimento bacteriano da *E. coli* e *S. Aureus*.

SANTOS et al, (2015) realizou um estudo com os extratos metanólicos de frutos de palmeiras amazônicas, dentre eles o tucumã e constatou que o tucumã tem como metabolitos: carotenoides totais e fontes relevantes de flavonoides amarelos, polifenóis totais e alta capacidade antioxidante.

Concentração mg/mL	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
C1 - 0,010	2,21 a	2,01 a	1,00 a	1,33 a
C2 - 0,015	2,33 a	3,00 b	1,00 a	1,47 a
C3 - 0,020	2,81 b	3,81 c	1,00 a	1,51 a
C4 - 0,050	3,01 c	4,81 d	1,00 a	1,66 b

Médias (mm) seguidas pela mesma letra para cada bactéria não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 3 - Avaliação antibacteriana através do extrato da casca do tucumã/soxhlet

QUIDEAU et al, (2011) afirma ainda que, os compostos químicos como os polifenóis encontrados no fruto do tucumã seja um dos responsáveis da ação antimicrobiana. Sendo que, trabalhos com outras plantas que tem em sua composição os polifenóis e flavonoides são responsáveis por inibir o crescimento bacteriano através dos extratos.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos por este trabalho permitem concluir que com extratos metanólicos da casca do tucumã foi encontrada atividade antibacteriana, no entanto os que apresentaram melhor atividade foram os extratos com os métodos estático e ultrassom que teve um bom desenvolvimento contra as linhagens testadas de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *K. pneumoniae*. A investigação de ação bactericida de frutos pouco estudadas, se faz uma ferramenta valiosa, para composição de novos medicamentos contra microrganismos, perigosos e degradantes aos seres vivos. O trabalho evidenciou que através dos testes, é possível definir concentrações capazes de inibir bactérias, porém estudos são necessários para verificar menores concentrações.

REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, S., CAROLINE, M. Estudo do potencial biotecnológico da polpa de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) in natura e da conservação das suas propriedades nutricionais em embalagens a vácuo. 2016.
- CHEMAT, F.; ZILL-E-HUMA; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrason. Sonochem.* 18. 813–835, 2011.
- DEWAN, S. S. Global Markets for Enzymes in Industrial Applications. *BCC Research*, v. 116, 2017.
- DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C., Química Nova na Escola, 1998.
- FLORA DO BRASIL. Turneraceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: . Acesso em: 16 fev. 2020.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 38, n. 2. 2014.
- JOBIM, M. L.; SANTOS, R. C. V.; Alves, C. F. S. et al.; antimicrobial activity Amazon *Astrocaryum aculeatum* extracts and its association to oxidative metabolism. *Microbiological Research*, v. 169, n. 4, p. 314– 323, 2014.
- MARINHO, H.A.; CASTRO, J.S. Carotenóides e valor de pró-vitamina A em frutos da região amazônica: pajurá, piquiá, tucumã e umari. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. Anais. Belém: SBF, 2002.
- MARTINS, C. R.; FARIAS, R. M.; Produção de alimentos x desperdício: tipos, causas e como reduzir perdas na produção agrícola – Revisão. *Revista da FZVA*, Vol.9, No.1, pp. 20-32, 2002.
- QUIDEAU, S et al. Antimicrobial, cytotoxic and antioxidante activities, and synthesis. **Chem Int**; 50: 586621, 2011.
- RAMASAMY, SETHI, P.; D. Antibacterial activity of ethanolic of the leaves of *Turnera ulmifolia* linn. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and research*. Vol 3, n 1, 2012.

SANTOS, M. F. G. et al. Amazonian Native Palm Fruits as Sources of Antioxidant Bioactive Compounds. *Antioxidants*, v. 4, n. 3, p. 591– 602, 2015.

SENA, R.F.; NUNES, M.L.; Utilizations of aro-industrial wastes in the processing of feeds for carniculture. *Revista Brasileira de Saúde e Produção animal*. Vol.7, No.2, pp. 94-102, 2006.

VILKHU, K.; MAWSON, R.; SIMONS, L.; BATES, D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. *Innov. Food Sci. and Emerg. Tech.* V 9, n.161–169, 2008.

VIANA, B.F; SILVA, F. O. *Biologia e ecologia da polinização / organizadoras Blandina Felipe Viana e Fabiana Oliveira da Silva*. - Salvador: EDUFBA, Rede Baiana de Polinizadores. 230 p.: il. - (Série Cursos de campo; v.2). 2010.

Data de aceite: 01/11/2021

Rafaela Lopes da Silveira

Graduanda. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) campus JK, Instituto de Ciência e Tecnologia Diamantina, Minas Gerais, Brasil
ID Lattes: 6128256740074291

Adeline Cristina Pereira Rocha

Mestre em Biocombustíveis. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) campus JK, Instituto de Ciência e Tecnologia Diamantina, Minas Gerais, Brasil
ID Lattes: 9312013606004988

Vivian Machado Benassi

Doutora. Docente da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) campus JK, Instituto de Ciência e Tecnologia Diamantina, Minas Gerais, Brasil
ID Lattes: 8244877867115110

RESUMO: Tendo em vista a presente preocupação com a situação ambiental do planeta, torna-se notório a importância do uso de tecnologias e processos de produção ambientalmente favoráveis. Nesse sentido, ressalta-se a relevância que as enzimas possuem quando comparadas com catalisadores químicos, uma vez que também aceleram reações, entretanto fornecendo produtos mais puros através de meios de produção menos agressivos ao meio ambiente. Dentre as enzimas com potencial biotecnológico, destacam-se as

lipases (triacilglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3), que são biocatalisadoras com ocorrência em um grande número de organismos e que dispõem de características extremamente atraentes para aplicações biotecnológicas.

PALAVRAS-CHAVE: Aplicação, Biotecnologia, Enzimas, Lipases.

LIPASES: REVIEW AND INDUSTRIAL APPLICATION

ABSTRACT: In view of the present concern with the environmental situation of the planet, the importance of using environmentally favorable technologies and production processes becomes clear. In this sense, it emphasizes the relevance that enzymes have when compared to chemical catalysts, since they also accelerate reactions, however providing purer products through means of production that are less aggressive to the environment. Among the enzymes with biotechnological potential, lipases (triacylglycerol acyl hydrolases, EC 3.1.1.3) stand out, which are biocatalysts that occur in a large number of organisms and have extremely attractive characteristics for biotechnological applications.

KEYWORDS: Application, Biotechnology, Enzymes, Lipase.

INTRODUÇÃO

As enzimas são catalisadoras das reações dos sistemas biológicos, facilitando a conversão de substratos em produtos, e exceto por um pequeno grupo de moléculas de RNA

catalítico, todas as enzimas são proteínas. Essas biomoléculas podem ser classificadas de acordo com a natureza da reação química que catalisam, as quais podem ser distribuídas em seis classes, conforme sugerido pelo sistema adotado pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), sendo elas: oxirredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (NELSON; COX, 2011).

Em comparação com os catalisadores químicos, as enzimas são extremamente vantajosas, visto que não possuem toxicidade, são biodegradáveis e permitem o reuso, contribuindo positivamente em questões ambientais. Além disso, as enzimas apresentam outras vantagens, tais como maior especificidade ao substrato, melhor qualidade do produto final e redução da produção de subprodutos, o que acarreta na redução de eventuais custos oriundos de purificação ao fim do processo (TEIXEIRA; MILAGRE, 2020).

Essas biomoléculas podem ser produzidas por diversos organismos como fungos filamentosos, leveduras, bactérias, plantas e animais e devido as várias vantagens as quais proporciona, seu uso na indústria vem aumentando consideravelmente com o decorrer dos anos. Pode-se mencionar a aplicação de enzimas em diversas vertentes industriais, como alimentícia, têxtil, detergentes, cosméticos, tratamento de efluentes, biocombustíveis e outros. Diante disso, a pesquisa de novas enzimas e o melhoramento do desempenho de catálise daquelas já conhecidas é de extrema importância no que tange a aplicação em larga escala (RIGOLDI *et al.* 2018).

Existe um vasto número de enzimas, dentre elas as lipases, que são biomoléculas detentoras de características como alta especificidade, estabilidade em solventes orgânicos e capacidade de atuar em reações de hidrólise e síntese. Essas particularidades fomentam seu potencial de aplicação, que é amplamente expresso em diferentes setores da indústria (SALIHU; ALAM, 2015; BILAL *et al.*, 2021).

LIPASES

As lipases, triacilglicerol acil-hidrolases (EC 3.1.1.3), compreendem um grupo de enzimas de grande ocorrência em vegetais, animais e microrganismos, que têm como papel fisiológico catalisar a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa, fornecendo diacilgliceróis, monoacilgliceróis, glicerol e ácidos graxos livres (Figura 1) (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2011; DELORME *et al.*, 2011).

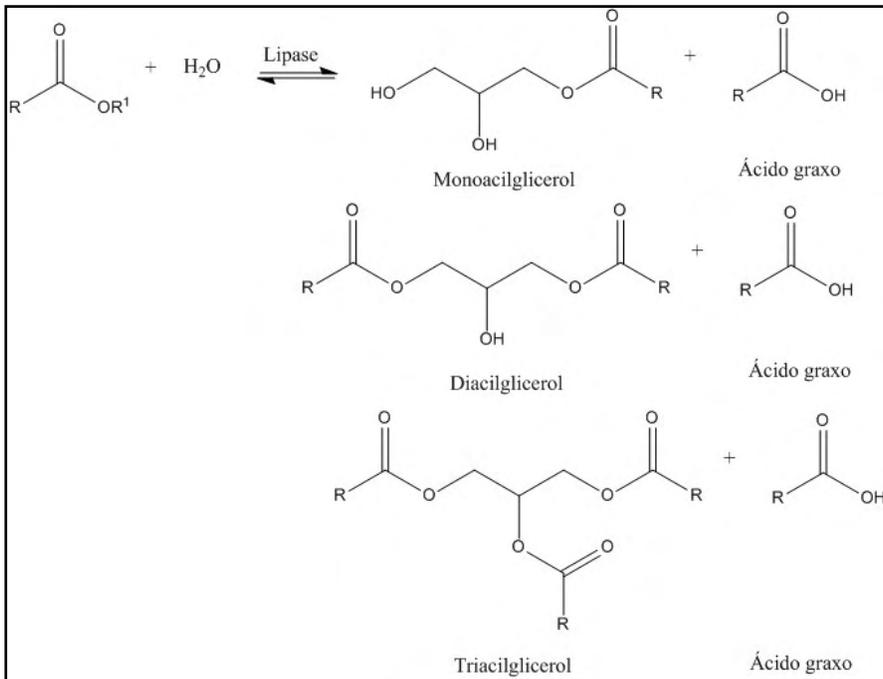


Figura 1 – Hidrólise de Triacilgliceróis.

Além disso, essas enzimas são capazes de catalisar reações de síntese como esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóólise e acidólise), aminólise (síntese de amidas) e lactonização (esterificação intramolecular) (Figura 2) (MESSIAS *et al.*, 2011).

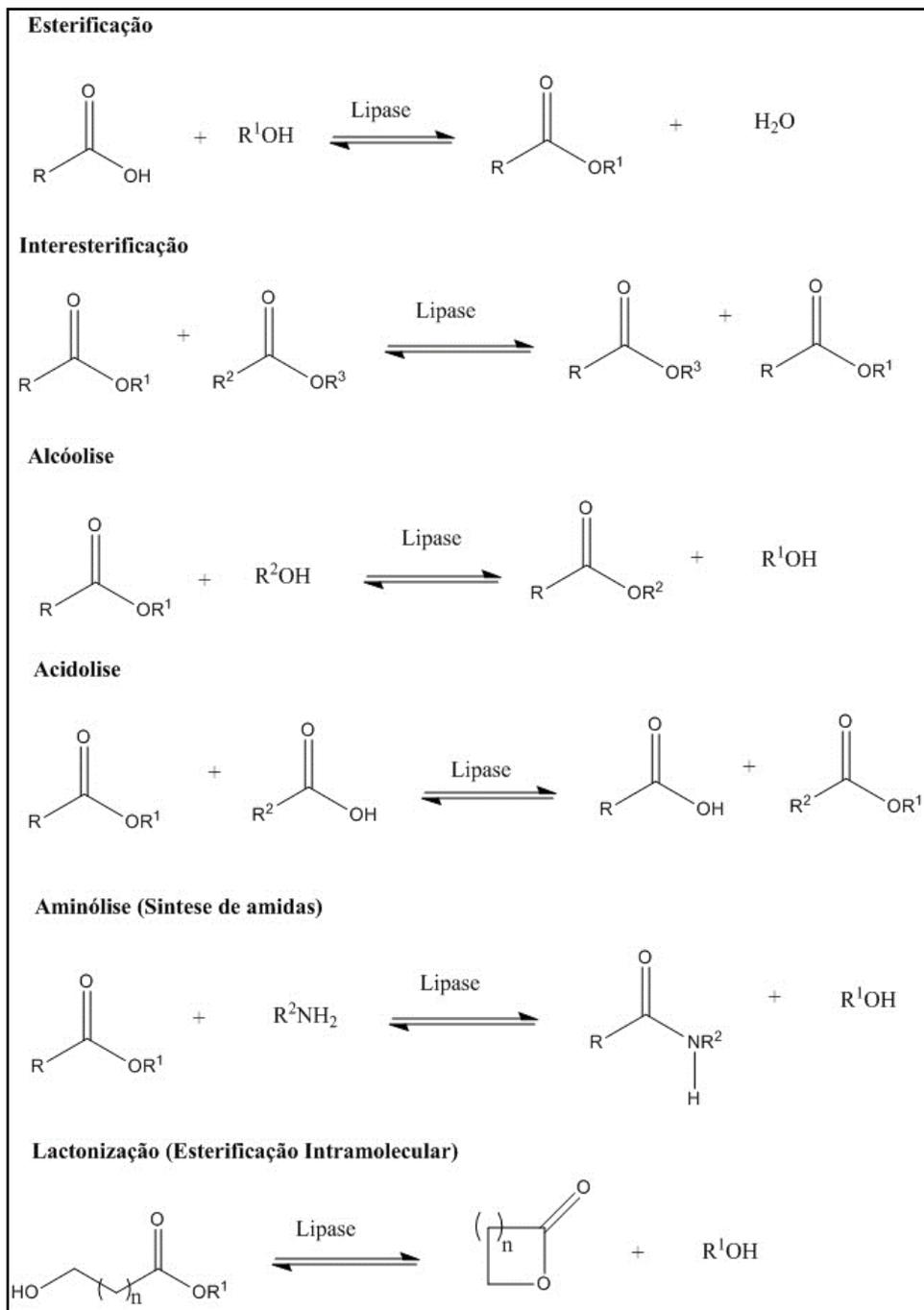


Figura 2 – Reações de síntese catalisadas por lipases.

Visto que as lipases catalisam reações de hidrólise e síntese, o direcionamento da reação é dado pela quantidade de água presente no meio reacional, sendo a hidrólise

a reação principal na presença de água, enquanto que sob condições limitadas e com a presença de solventes orgânicos, as reações de síntese são favorecidas (BORRELLI; TRONO, 2015). Dessa maneira, essas enzimas podem ser classificadas conforme segue abaixo (PAQUES; MACEDO, 2006; POHANKA, 2019):

1. Lipases regioseletivas: caracterizam-se pela especificidade em relação à posição de hidrólise do triacilglicerol, sendo subdivididas em:
 - a. Lipases não específicas: hidrolisam ésteres de ácidos graxos primários ou secundários, liberando ácidos graxos das posições 1(3) ou 2 da cadeia;
 - b. Lipases 1,3-específicas: hidrolisam apenas ésteres de ácidos graxos primários, ou seja, nas posições 1 ou 3;
2. Lipases tipo-seletivas: caracterizam-se por possuírem especificidade de hidrólise quanto ao tamanho da cadeia carbônica ou ao número de insaturações do triacilglicerol;
3. Lipases enantioseletivas: capazes de discriminar enantiômeros em uma mistura racêmica, fator relacionado à forma com que o substrato se liga ao centro ativo da enzima.

As características físico-químicas das lipases variam consideravelmente em função da sua origem, mas de uma maneira geral, são enzimas ácidas com ponto isoelétrico variando entre 4 e 5, apresentam massa molecular entre 20 e 75 kDa, atividade em pH entre 4 e 9 e em temperaturas variando de 25 a 70 °C sendo a atividade ideal e estabilidade atingida a 30-40 °C na maioria dos casos (RIBEIRO *et al.*, 2011).

Todas as lipases com estrutura tridimensional resolvida apresentaram um padrão conformacional característico das α/β hidrolases, constituídas por fitas β paralelas, sendo a segunda antiparalela em relação as demais, intercaladas por α -hélices. Entretanto, a curvatura e disposição das fitas β e α -hélices pode variar de acordo com a origem da enzima (PASCOAL *et al.*, 2018; VERMA; MEGHWANSHI; KUMAR, 2021).

O sítio ativo da enzima é formado pela tríade catalítica dos aminoácidos serina, ácido aspártico ou glutâmico e histidina, sendo a serina o resíduo nucleofílico, caracterizando as lipases como serina hidrolases (JAEGER; REETZ, 1998). Este resíduo nucleofílico está sempre localizado em uma curva acentuada, denominada cotovelo nucleofílico, que é identificado pelo pentapeptídeo Gly – X – Ser – X – Gly, onde X representa qualquer um dos 20 aminoácidos, sendo o resíduo de glicina altamente conservado (NARDINI; DIJKSTRA, 1999; CYGLER; SCHRAG; ERGAN, 1992).

Diferentemente de muitas enzimas, o centro ativo da lipase não é exposto na superfície da proteína, este é recoberto por uma α -hélice denominada “*lid*” ou tampa anfifílica, constituída por aminoácidos polares na parte externa e por aminoácidos apolares na parte interna. Essa tampa pode assumir duas conformações, fechada e aberta.

Na conformação fechada, a tampa bloqueia o sítio ativo, impedindo o acesso do

substrato, enquanto que na conformação aberta o centro ativo é exposto para o substrato (VAZ; CHOUPINA, 2012). Em soluções aquosas, as conformações estão em equilíbrio, sendo a conformação fechada a favorecida, enquanto que na presença de substratos hidrofóbicos dispersos em água a forma aberta é favorecida, expondo o sítio ativo para que o substrato sofra catálise (ALNOCH *et al.*, 2020).

As lipases são enzimas solúveis em água, portanto, as reações lipolíticas ocorrem utilizando um substrato lipídico em forma de emulsão, possuindo melhor desempenho quando a concentração de substrato é suficiente para formar agregados ou emulsões micelares, visto que em um ambiente com grande número de agregados lipídicos próximos à superfície da enzima alteram o ambiente dielétrico nessa região, propiciando interações mais fortes com o substrato lipídico do que com a água, o que faz com que muitas lipases apresentem uma mudança conformacional (PASCOAL *et al.*, 2018; CORTEZ; CASTRO; ANDRADE, 2017).

Esse aumento de atividade em uma interface água/lipídio é chamado ativação interfacial e segundo Foresti e Ferreira (2007) foi descrito inicialmente por Sarda e Desnuelle em 1958, que postularam que a lipase se tornaria ativa quando absorvida na interface devido a uma mudança conformacional em sua estrutura.

Por muito tempo, presumiu-se que o fenômeno da ativação interfacial estivesse intimamente relacionado à presença da tampa que recobre o sítio ativo devido às mudanças conformacionais, e eram fatores utilizados para definir uma enzima como lipase, contudo, algumas lipases como as de *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida antártica B* e *Burkholderia glumae* não apresentaram ativação interfacial, entretanto, ainda possuíam uma tampa anfífilica recobrando o sítio ativo. Tal observação levou a conclusão de que o fenômeno da ativação interfacial e a presença da tampa são critérios inadequados para classificar uma enzima como lipase, sendo a definição atual bem simples, uma lipase é uma carboxilesterase que catalisa a hidrólise de acilgliceróis de cadeia longa (JAEGER; REETZ, 1998; CORTEZ; CASTRO; ANDRADE, 2017).

O primeiro passo do mecanismo envolvido na catálise dos triglicerídeos é a ativação da serina por desprotonação, a partir da histidina e do resíduo ácido (Asp ou Glu). Com a nucleofilicidade da hidroxila da serina aprimorada, ocorre o ataque à um dos grupos carbonila do substrato, levando a formação de um intermediário tetraédrico que é estabilizado por ligação de hidrogênio com nitrogênio de resíduos da cadeia principal. Um álcool é então liberado, deixando para trás um complexo ácil-enzima. Em sequência, ocorre a etapa denominada desacilação, que consiste no ataque nucleofílico à carbonila da ácil-enzima por uma molécula de água formando um segundo intermediário tetraédrico, para a liberação do ácido graxo e a regeneração da enzima (REIS *et al.*, 2009; AKOH *et al.*, 2004).

A importância biotecnológica e a expansão no uso de lipases em diversas aplicações industriais são dados principalmente devido a sua forma específica de ação, bem como a capacidade de catalisar diversos tipos de reação sem requerer cofatores e a sua estabilidade

em solventes orgânicos. Seu potencial de biocatálise é amplamente expresso na indústria de papel e celulose, alimentícia, têxtil, detergentes, fármacos, cosméticos, tratamento de efluentes, biocombustíveis e outros (SALIHU; ALAM, 2015).

APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DAS LIPASES

Atuação das lipases nas indústrias de papel e celulose

Na indústria de papel e celulose, componentes hidrofóbicos da madeira como triglicerídeos e ceras, coletivamente nomeados como *pitch*, causam problemas graves no processo de fabricação (SHARMA; CHISTRY; BANERJEE, 2001). A Nippon Paper Industries, no Japão, desenvolveu um método que utiliza lipases fúngicas que hidrolisam 90% dos triglicerídeos, no qual as enzimas são aplicadas no processo de modificação da polpa crua, removendo o *pitch*. Dessa forma, auxiliando no branqueamento e diminuindo o uso de agentes químicos (JAEGER; REETZ, 1998; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Atuação das lipases na indústria alimentícia

Na indústria alimentícia, as lipases são úteis na produção de diversos produtos como derivados de leite, pão, sucos, chás e produtos fermentados, atuando no processamento, na melhoria da qualidade e no desenvolvimento de sabor e aroma do produto formado (ULLAH *et al.*, 2016).

Ésteres de ácidos graxos de cadeia curta e alguns álcoois são importantes compostos responsáveis pelo aroma de alguns alimentos, podendo ser obtidos por síntese química ou extração de fontes naturais. Os custos extremos da extração de fontes naturais atrelados a formação de compostos indesejáveis a partir da síntese química fazem com que a esterificação por lipases, em especial as de fonte microbianas, seja uma ótima alternativa para a síntese de compostos de sabor (PRIYANKA *et al.*, 2018).

No setor de laticínios, as lipases são presentes no processo de fabricação de manteiga, creme de leite e na maturação de queijos, visto que a lipólise da gordura do leite libera ácidos graxos, e quando estes são de cadeia curta há o desenvolvimento do sabor e aroma específicos (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Na panificação, essas enzimas são utilizadas como aditivos, melhorando a maleabilidade, textura e acréscimo do volume da massa, além de atuar no aumento de vida de prateleira do produto. Essas características são obtidas como consequência da degradação dos triglicerídeos do trigo, modificando as interações com o glúten e fazendo com que este possua uma rede mais forte e elástica. Essa interação também é evidenciada quando aplicadas na fabricação de macarrão, conferindo maior maciez à massa (CASTRO *et al.*, 2004; VAZ; CHOUPINA, 2012; SARMAH *et al.*, 2017).

Sabe-se que óleos e gorduras são importantes constituintes dos alimentos e que suas características sensoriais, valor nutricional e propriedades físicas são estritamente

influenciadas pelo tamanho da cadeia, grau de insaturação e posição do ácido graxo na estrutura do glicerol. Posto isso, a seletividade das lipases faz com que estas se tornem interessantes no que diz respeito à modificação desses atributos nos triglicerídeos. Assim, lipídios pouco desejáveis e pouco onerosos podem ser transformados em outros com particularidades mais cobiçadas e valor agregado (SHARMA; CHISTRY; BANERJEE, 2001).

Além das aplicações supracitadas, as lipases também são utilizadas no processo de preparação dos glicerídeos para a fabricação de margarinas, reduzindo o teor de gorduras saturadas sem produzir gorduras *trans*, como biossensores para o controle da qualidade de alimentos quanto a presença de triacilgliceróis e redução da gordura de carne e peixes (COLLA; REINEHR; COSTA, 2012; SARMAH *et al.*, 2017; FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019).

Vale citar que, apesar da sua grande proficuidade na indústria de alimentos, quando empregadas em condições não controladas, essas enzimas podem ocasionar efeitos indesejados como sabores e aromas desagradáveis em derivados de leite e outros alimentos ricos em lipídios, visto que a lipólise da gordura produz muitos ácidos graxos livres que estão presentes no processo de rancificação (ANDREWES *et al.*, 2007).

Atuação das lipases na indústria têxtil

Na indústria têxtil, as lipases são empregadas na remoção de lubrificantes dos tecidos para aumentar a absorção de tintas, além do melhoramento de tecidos de denim, utilizados para fabricar o jeans, reduzindo a frequência de rachaduras (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Segundo Assis e Munaro (2016), fibras de poliéster requerem grandes quantidades de água em um sistema de alta temperatura e pressão para alcançar velocidades de tingimento aceitáveis a nível industrial, visto que o polímero absorve apenas 4% de umidade, diminuindo a sua interação com o banho de tingimento. Dessa forma, modificações realizadas por hidrólise, que podem ser conduzidas por lipases, otimizam o processo uma vez que aumenta o número de grupos carboxílicos facilitando a adsorção de corantes dispersos durante o tingimento, reduzindo o consumo de insumos e produção de efluentes (ASSIS; MUNARO, 2016).

Atuação das lipases na indústria de detergentes

Uma das maiores aplicações das lipases é na forma de aditivos em detergentes para uso industrial ou doméstico, podendo ser acompanhadas de uma ou mais enzimas como proteases, amilases ou celulasas. A grande vantagem do seu uso é a redução da carga ambiental do detergente, uma vez que são biodegradáveis e substituem produtos químicos nocivos ao ambiente, especialmente à vida aquática (MESSIAS *et al.*, 2011; SAMOYLOVA *et al.*, 2019).

As lipases utilizadas nessas formulações são preferencialmente aquelas com capacidade de hidrolisar gorduras com várias composições, resistência a surfactantes,

agentes oxidantes e condições de lavagem relativamente adversas (30-60°C, pH 10-11) possuindo atividade ideal em meio alcalino (GUNCHEVA; ZHIRYAKOVA, 2011; *et al.*, 2016).

A atuação da enzima no detergente, seja líquido ou em pó, consiste basicamente na hidrólise dos lipídios em monoglicerídeos, diglicerídeos, glicerol e ácidos graxos que são mais solúveis que a gordura de origem, favorecendo a remoção de manchas de gordura em roupas, louças ou ao que forem aplicadas (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Atuação das lipases na indústria farmacêutica

Ao longo dos anos, a síntese de substâncias bioativas tem sido praticada por meio de química orgânica convencional, contudo, essa rota pode ocasionar inconvenientes como a formação de mistura racêmica. A enantioseletividade das lipases faz com que estas sejam uma alternativa na resolução de misturas racêmicas, uma vez que a obtenção de produtos opticamente puros é um fator chave na produção de fármacos, pois dois isômeros podem possuir atividade biológica distinta ou até mesmo serem tóxicos (PASCOAL *et al.*, 2018).

Nesse sentido, as lipases vêm sendo exploradas na produção de antidepressivos, anti-hipertensivos, medicamentos vasodilatadores, medicamentos para distúrbio do sistema nervoso central, anti-inflamatórios e outros (CONTESINI *et al.*, 2020).

Aplicação das lipases na indústria de cosméticos

Devido a sua capacidade de hidrolisar moléculas lipídicas, as lipases podem ser utilizadas de forma ativa em cosméticos para limpeza facial, *shampoo* para tratamento de cabelos oleosos e em tratamentos de celulite e gordura localizada. Além disso, essas enzimas também podem atuar na síntese de compostos extremamente úteis para a indústria cosmética como ésteres biosurfactantes que são importantes ingredientes em formulações emulsificantes e em agentes espumantes, ésteres de sabor e fragrância utilizados em desodorantes, perfumes, sabonetes, batom e creme dental e, ainda, ésteres emolientes aplicados em cremes de pele e condicionadores de cabelo (KHAN; RATHOD, 2015; BELI; MAGESTE; TAKETANI, 2019).

Aplicação das lipases no tratamento de efluentes

De maneira geral, as lipases estão presentes em processos de tratamento de efluentes da indústria de laticínios, matadouros, pesticidas, refinarias de petróleo, restaurantes e outros que contêm altos teores de lipídeos e ésteres a partir da ação de microrganismos lipolíticos presentes em lodo ativado (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; FACCHINI *et al.*, 2015).

Segundo Samoylova *et al.* (2019), bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* produzem lipases que atuam nas ligações ésteres presentes em moléculas de pesticidas auxiliando na hidrólise completa do composto (SAMOYLOVA *et al.*, 2019). Enquanto que Navvabi *et al.* (2018) relataram eficiência de cepas da bactéria *Psychrobacter okhotskensis* no tratamento de resíduos com carga lipídica elevada devido a sua atividade lipolítica

(NAVVABI *et al.*, 2018).

Biocombustíveis

Atualmente, o processo catalítico empregado na produção de biodiesel (Figura 3) é ácido ou básico, que, por sua vez, são catalisadores químicos e quando utilizados apresentam alguns inconvenientes como alto consumo de energia, reações de saponificação quando catalisadores básicos são utilizados na conversão de óleos ricos em ácidos graxos livres, alto custo de recuperação e purificação dos produtos finais devido a sua baixa pureza e geração de altos níveis de águas residuais (NORJANNAH *et al.*, 2016).

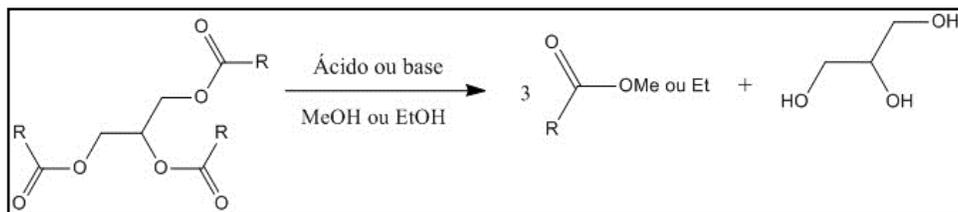


Figura 3 – Reação de transesterificação empregando catalisador ácido ou básico

Devido a possibilidade das lipases produzirem ésteres tanto a partir de triglicerídeos quanto de ácidos graxos livres, estas enzimas tornam-se uma opção atrativa no processo de produção do biodiesel, uma vez que seu uso não favorece a formação de subprodutos como sabão, e permite a utilização de óleos de baixo valor agregado. Aliado a isso, as condições de operação são mais amenas em comparação àquelas onde catalisadores ácidos ou básicos são empregados, reduzindo o consumo de energia, os produtos da reação possuem pureza elevada, fazendo com que poucos processos de purificação sejam necessários e por serem catalisadores biológicos, impasses ambientais também são amenizados como geração de níveis mais baixos de efluentes (MARTINS *et al.*, 2017; MOAZENI; CHEN; ZHANG, 2019).

Sobretudo, a síntese de biodiesel catalisada por lipase não é feita comercialmente, uma vez que se torna um processo dispendioso devido ao alto custo de obtenção do biocatalisador. Arelado a isso, está o fato de que essas enzimas são sensíveis ao metanol, podendo desnaturar. Entretanto, ainda assim, há grandes esforços em pesquisas acerca da otimização do processo e redução do custo, visto que existem vantagens relevantes quando comparado à síntese utilizando-se catalisadores químicos (KUEPETHKAEW *et al.*, 2017; THANGARAJ *et al.*, 2018).

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), ao Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis, CAPES, FAPEMIG e CNPq.

REFERÊNCIAS

- AKOH, C. C.; LEE, G. C.; LIAW, Y. C.; HUANG, T. H.; SHAW, J. F. **GDSL family of serine esterases/lipases**. *Progress in Lipid Research*, v. 43, n. 6, p. 534-552, nov. 2004.
- ALNOCH, R. C.; SANTOS, L. A.; ALMEIDA, J. M.; KRIEGER, N.; MATEO, C. **Recent Trends in Biomaterials for Immobilization of Lipases for Application in Non-Conventional Media**. *Catalysts*, v. 10, n. 6, p. 697, 20 jun. 2020.
- ANDREWES, P.; BALDWIN, A.; BROOME, A.; HILL, B.; HOLLAND, R.; MILLS, O.; NEWSTEAD, D. **Detection of lipase in skim and whole milk powders using triheptanoin as a substrate**. *International Dairy Journal*, v. 17, n. 6, p. 587-595, jun. 2007.
- ASSIS, A. H. C.; MUNARO, M. **Melhoria no processo de tingimento de fibras de poliéster após hidrólise por enzima lipase**. *Evidência - Ciência e Biotecnologia*, v. 15, n. 2, p. 113-128, 7 jun. 2016.
- BELI, C. M.; MAGESTE, J. M.; TAKETANI, N. F. **Bioprospecção de enzimas para cosmética: seu impacto na biotecnologia**. *Revista Ensaio Pioneiros*, v. 3, n. 2, p. 10-24, 2019.
- BILAL, M.; FERNANDES, C. D.; MEHMOOD, T.; NADEEM, F.; TABASSAM, Q.; FERREIRA, L. F. R. **Immobilized lipases-based nano-biocatalytic systems — A versatile platform with incredible biotechnological potential**. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 175, p. 108-122, abr. 2021.
- BORRELLI, G.; TRONO, D. **Recombinant Lipases and Phospholipases and Their Use as Biocatalysts for Industrial Applications**. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, n. 9, p. 20774-20840, 1 set. 2015.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. **Modificação de óleos e gorduras por biotransformação**. *Química Nova*, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.
- COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. **Aplicações e produção de lipases microbianas**. *Revista CIATEC*, v. 4, n. 2, p. 1-14, 2012.
- CONTESINI, F. J.; DAVANÇO, M. G.; BORIN, G. P.; VANEGAS, K. G.; CIRINO, J. P. G.; MELO, R. R.; MORTENSEN, U. H.; HILDÉN, K.; CAMPOS, D. R.; CARVALHO, P. O. **Advances in Recombinant Lipases: production, engineering, immobilization and application in the pharmaceutical industry**. *Catalysts*, v. 10, n. 9, p. 1032-1065, 9 set. 2020.
- CORTEZ, D. V.; CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S. S. **Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação**. *Química Nova*, v. 40, n. 1, p. 85-96, 2017.
- CYGLER, M.; SCHRAG, J. D.; ERGAN, F. **Advances in Structural Understanding of Lipases**. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v. 10, n. 1, p. 143-184, dez. 1992.
- FACCHINI, F. D. A.; VICI, A. C.; PEREIRA, M. G.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. T. M. **Enhanced lipase production of *Fusarium verticillioides* by using response surface methodology and wastewater pretreatment application**. *Journal of Biochemical Technology*, v. 6, n. 3, p. 996-1002, 2015.

FILHO, D. G.; SILVA, A. G.; GUIDINI, C. Z. **Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 103, n. 18, p. 7399-7423, 2 ago. 2019.

FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. **Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, n. 4, p. 769-777, mar. 2007.

GUNCHEVA, M.; ZHIRYAKOVA, D. **Catalytic properties and potential applications of Bacillus lipases.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 68, n. 1, p. 1-21, jan. 2011.

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

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. **Microbial lipases form versatile tools for biotechnology.** *Tibtech*, v. 16, set. 1998.

KUEPETHKAEW, S.; SANGKHARAK, K.; BENJAKUL, S.; KLOMKLAO, S. **Optimized synthesis of biodiesel using lipase from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hepatopancreas.** *Renewable Energy*, v. 104, p. 139-147, abr. 2017.

KHAN, N. R.; RATHOD, V. K. **Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: a review.** *Process Biochemistry*, v. 50, n. 11, p. 1793-1806, nov. 2015.

MARTINS, P. A.; ALMEIDA, K. C.; COSTA, P. P. K. G.; PACHECO, T. F.; MARCO, J. L.; SALUM, T. F. C. **Produção de lipases bacterianas e aplicação à síntese de biodiesel.** In: IV ENCONTRO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA EMBRAPA AGROENERGIA, 4, 2017, Brasília. *Anais*. Brasília: CNPTIA, 2017. p. 95-100.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. **Lipases microbianas: produção, propriedades e aplicações biotecnológicas.** *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina, v. 32, n. 2, p. 213-234, 30 set. 2011.

MOAZENI, F.; CHEN, Y.; ZHANG, G. **Enzymatic transesterification for biodiesel production from used cooking oil, a review.** *Journal of Cleaner Production*, v. 216, p. 117-128, abr. 2019

NARDINI, M.; DIJKSTRA, B. W. **α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing.** *Current Opinion in Structural Biology*, v. 9, p. 732-737, 1999.

NAVVABI, A.; RAZZAGHI, M.; FERNANDES, P.; KARAMI, L.; HOMAEI, A. **Novel lipases discovery specifically from marine organisms for industrial production and practical applications.** *Process Biochemistry*, v. 70, p. 61-70, jul. 2018.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger.** Porto Alegre: Artmed, 2011.

NORJANNAH, B.; ONG, H. C.; MASJUKI, H. H.; JUAN, J. C.; CHONG, W. T. **Enzymatic transesterification for biodiesel production: a comprehensive review.** *RSC Advances*, v. 6, n. 65, p. 60034-60055, 2016.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. **Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais.** *Química Nova*, v. 29, n. 1, p.93-99, 2006.

PASCOAL, A.; ESTEVINHO, L. M.; MARTINS, I. M.; CHOUPINA, A. B. **Review: novel sources and functions of microbial lipases and their role in the infection mechanisms.** *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 104, p. 119-126, dez. 2018.

POHANKA, M. **Biosensors and Bioassays Based on Lipases, Principles and Applications, a Review.** *Molecules*, v. 24, n. 3, p. 616, 10 fev. 2019.

PRIYANKA, P.; TAN, Y.; KINSELLA, G. K.; HENEHAN, G. T.; RYAN, B. J. **Solvent stable microbial lipases: current understanding and biotechnological applications.** *Biotechnology Letters*, v. 41, n. 2, p. 203-220, 7 dez. 2018.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M.; MILLER, R. **Lipases at interfaces: a review.** *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 148, p. 237-250, mar. 2009.

RIBEIRO, B. D.; CASTRO, A. M.; COELHO, M. A. Z.; FREIRE, D. M. G. **Production and Use of Lipases in Bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production.** *Enzyme Research*, v. 2011, p. 1-16, 2011.

RIGOLDI, F.; DONINI, S.; REDAELLI, A.; PARISINI, E.; GAUTIERI, A. **Review: engineering of thermostable enzymes for industrial applications.** *Apl Bioengineering*, v. 2, n. 1, p. 011501, mar. 2018.

SALIHU, A.; ALAM, M. Z. **Solvent tolerant lipases: a review.** *Process Biochemistry*, v.50, n. 1, p. 86-96, jan. 2015.

SAMOYLOVA, Y. V.; SOROKINA, K. N.; PILIGAEV, A. V.; PARMON, V. N. **Application of Bacterial Thermostable Lipolytic Enzymes in the Modern Biotechnological Processes: a review.** *Catalysis in Industry*, v. 11, n. 2, p. 168-178, abr. 2019.

SARDA, L.; DESNUELLE, P. **Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion.** *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 30, n. 3, p. 513-521, dez. 1958.

SARMAH, N.; REVATHI, D.; SHEELU, G.; RANI, K. Y.; SRIDHAR, S.; MEHTAB, V.; SUMANA, C. **Recent advances on sources and industrial applications of lipases.** *Biotechnology Progress*, v. 34, n. 1, p. 5-28, 4 dez. 2017.

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

TEIXEIRA, I. S.; MILAGRE, C. D. F. **Evolução dirigida de enzimas: pequenas modificações, melhores biocatalisadores.** *Química Nova*, v.46, n.6, p. 773-786, 2020.

THANGARAJ, B.; SOLOMON, P. R.; MUNIYANDI, B.; RANGANATHAN, S.; LIN, L. **Catalysis in biodiesel production - a review.** *Clean Energy*, v. 3, n. 1, p. 2-23, 17 dez. 2018.

ULLAH, S.; MALOOK, I.; BASHAR, K. U.; RIAZ, M.; ASLAM, M. M.; REHMAN, Z. U.; MALOOK, I.; FAYYAZ, M.; JAMIL, M. **Purification and Application of Lipases from Pseudomonas Species.** *Journal of Scientific & Industrial Research Series B*, p. 111-116, 2016.

VAZ, M.; CHROUPINA, A. **Lipases: Biocatalizadores da Hidrólise de Triacilgliceróis**. *Revista Eletrônica de Biologia*, v. 5, n. 3, p. 42-58, 2012.

VERMA, S.; MEGHWANSHI, G. K.; KUMAR, R. **Current perspectives for microbial lipases from extremophiles and metagenomics**. *Biochimie*, v. 182, p. 23-36, mar. 2021.

AVALIAÇÃO IN SILICO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL FOLIAR DE COLÔNIA (*Alpinia zerumbet*)

Data de aceite: 01/11/2021

Data de submissão: 13/09/2021

Suelen Carneiro de Medeiros

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Campus Morada Nova
Morada Nova - Ceará
<http://lattes.cnpq.br/9010177694544049>

Igor Lima Soares

Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Ceará
Fortaleza – Ceará
<http://lattes.cnpq.br/3679739459003212>

Gleilton Weyne Passos Sales

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal do Ceará
Fortaleza - Ceará
<http://lattes.cnpq.br/7835870865998265>

Mary Anne Medeiros Bandeira

Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Ceará
Fortaleza - Ceará
<http://lattes.cnpq.br/629188701903402>

RESUMO: A espécie *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm (Zingiberaceae), conhecida popularmente como colônia, é uma erva aromática medicinal e ornamental, apresentando promissora aplicação para as atividades ansiolítica, antidepressiva, antioxidante e antiespasmódica. A abordagem *in silico* é um conjunto de técnicas computacionais

possibilitando estimar propriedades farmacocinéticas, farmacodinâmicas e toxicológicas de substâncias químicas, contribuindo para as etapas no desenvolvimento de novos candidatos à fármacos. Com isso, o objetivo do presente estudo é avaliar o potencial farmacocinético do óleo essencial de *A. zerumbet* como insumo fitomedicamentoso antimicrobiano, por meio de técnicas de análise computacional. Para isto, o óleo essencial foi obtido por meio de técnica de arraste à vapor d'água, em extrator do tipo Clevenger a partir das folhas de *A. zerumbet* e os componentes do óleo essencial foram identificados e desenhados separadamente por meio do software ACD/ChemSketch. As moléculas foram analisadas utilizando o *software* PASS Online para se determinar as atividades antiviral, antibacteriana e antifúngica, bem como analisados com a plataforma SwissADME para estimar a possibilidade de absorção intestinal passiva, a permeação de pequenas moléculas através da barreira hematoencefálica e a possibilidade de ligação a glicoproteína P. Conforme evidenciado todas as substâncias apresentam potencial de aplicação contra diferentes tipos de vírus e outros microrganismos como bactérias e fungos. Além disso, os constituintes do óleo essencial de *A. zerumbet* tem maior probabilidade de permearem até os tecidos cerebrais, mas não são potenciais substratos para glicoproteína P. Portanto, de acordo com as análises realizadas através das ferramentas computacionais descritas, o óleo essencial de *A. zerumbet* é um potencial alvo farmacológico por ter apresentado em estudos *in silico* potenciais atividades

antiviral, antibacteriana e antifúngica, podendo ser potencialmente utilizadas em distúrbios neurológicos, visto que os componentes do óleo são capazes de penetrar os tecidos cerebrais, e como quimiossensibilizadores atuando em conjunto com outros fármacos.

PALAVRAS-CHAVE: *Alpinia zerumbet*, Óleo Essencial, Infecções

IN SILICO EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL POTENTIAL OF COLONIA FOLIAR ESSENTIAL OIL (*Alpinia zerumbet*)

ABSTRACT: The species *Alpinia zerumbet* (Pers.) BL Burt & RM Sm (Zingiberaceae), popularly known as colony, is a medicinal and ornamental aromatic herb, presenting promising application for anxiolytic, antidepressant, antioxidant and antispasmodic activities of computational techniques enabling the estimation of pharmacokinetic, pharmacodynamic and toxicological properties of chemical substances, contributing to the steps in the development of new drug candidates. Thus, the aim of the present study is to evaluate the pharmacological potential of *A. zerumbet* essential oil as an antimicrobial phytomedicine, through computational analysis techniques. For this purpose, the essential oil was obtained by means of a water vapor drag technique, in a Clevenger type extractor from the leaves of *A. zerumbet*, and the essential oil components were identified and drawn separately using the ACD/software ChemSketch. Molecules were analyzed using the PASS Online software to determine antiviral, antibacterial and antifungal activities, as well as analyzed with the SwissADME platform to estimate the possibility of passive intestinal absorption, the permeation of small molecules across the blood-brain barrier and the possibility of binding the P-glycoprotein. As shown, all substances have potential application against different types of viruses and other microorganisms such as bacteria and fungi. In addition, the constituents of the essential oil of *A. zerumbet* are more likely to permeate into the brain tissues, but they are not potential substrates for P-glycoprotein. Therefore, according to the analyzes carried out using the computational tools described, the essential oil of *A. zerumbet* is a potential pharmacological target for having presented in in silico potential antiviral, antibacterial and antifungal activities, and can potentially be used in neurological disorders, as that the components of the oil are able to penetrate brain tissue, and as chemosensitizers acting in conjunction with other drugs.

KEYWORDS: *Alpinia zerumbet*, Essential oil, Infections.

1 | INTRODUÇÃO

A espécie *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm (Zingiberaceae), conhecida popularmente como colônia, é uma erva aromática medicinal e ornamental, perene e de até três metros de altura, a qual apresenta folhas estreitas e longas (TESCHKE; XUAN, 2018). O vegetal é oriundo do continente asiático, mas encontra-se distribuído em todas as regiões do Brasil (LORENZI; MATOS, 2008).

As partes aéreas da erva são popularmente utilizadas por comunidades do Nordeste brasileiro na forma de chás por infusão para o manejo de diferentes condições de saúde, como hipertensão arterial, afecções cardíacas, ansiedade, bem como tratamento de

estados febris e gripais (MAGALHÃES; BANDEIRA; MONTEIRO, 2020).

Os estudos pré-clínicos demonstram que derivados vegetais de *A. zerumbet* apresentam promissora aplicação para as atividades ansiolítica, antidepressiva, antioxidante e antiespasmódica (CHAN; WONG; CHAN, 2017). Estudos clínicos apontam evidências para a aplicação dos extratos de colônia como produtos fitoterapêuticos hipotensores, de caráter levemente diurético, enquanto o óleo essencial da espécie foi relatado como um fitoproduto auspicioso para a terapia complementar da fibromialgia (CHAN; WONG; CHAN, 2017).

Os óleos essenciais são derivados vegetais provenientes do metabolismo secundário das plantas, sendo definidos como misturas complexas de substâncias voláteis, de caráter lipofílico e que apresentam usualmente odor característico (MILLEZI et al., 2014). Dentre as potencialidades de aplicação terapêutica dos óleos essenciais, destacam-se as ações antifúngica, antibacteriana, antiviral, anticancerígena, antioxidante, anti-inflamatória, antiespasmódica, ansiolítica, dentre outras (GOYAL et al., 2020).

As investigações que visam a obtenção de substâncias de origem natural com potencial de aplicação farmacêutico incluem diversas etapas como extração, isolamento, caracterização molecular e estudos pré-clínicos e clínicos, as quais consomem tempo considerável, bem como demandam custos significativos (ZHANG et al., 2021). Segundo Akkari et al. (2016) e Finnato (2018), apesar dos investimentos, apenas uma a cada 10.000 moléculas investigadas pela indústria farmacêutica se torna um medicamento comercializável.

A abordagem *in silico* consiste em um conjunto de técnicas informatizadas que possibilita estimar propriedades farmacocinéticas, farmacodinâmicas e toxicológicas de substâncias químicas, contribuindo para as etapas de pesquisa e desenvolvimento de novos candidatos à fármacos (TIAN et al., 2015).

A busca por insumos farmacêuticos ativos utilizando ferramentas computacionais é considerada mais ágil, barata e menos árdua em relação ao emprego dos ensaios convencionais *in vivo* e *in vitro* (WANG et al., 2015; WU et al., 2016). Porém, as análises *in silico* ainda são consideradas complementares e não substituem completamente a necessidade dos modelos pré-clínicos atualmente já consolidados (VICTAL et al., 2014).

Segundo Dhingra et al. (2020) nos últimos 20 anos, registra-se mundialmente o aumento da resistência de microorganismos aos agentes quimioterápicos convencionais, implicando no crescimento no número de óbitos associados a infecções, bem como de custos médicos e tempo de estadia em unidades hospitalares. Porém, observa-se que a proporção de descoberta de novos agentes antimicrobianos de alta eficácia é reduzida em relação ao surgimento de mecanismos de resistência desenvolvidos pelos patógenos (LEWIS, 2013).

Ventola (2015), sugere que a indústria farmacêutica perdeu parte do interesse na produção e desenvolvimento de agentes antimicrobianos, devido a necessidade de altos

investimentos atrelados a um menor retorno financeiro, com base na baixa permanência das drogas no mercado (devido a crescente resistência antimicrobiana) e ao lucro reduzido em relação àquele atingido pela comercialização de outras classes terapêuticas.

Considerando este contexto, o objetivo do presente estudo é avaliar o potencial farmacológico do óleo essencial de *A. zerumbet* como insumo fitomedicamentoso antimicrobiano, por meio de técnicas de análise computacional.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

As partes foliares frescas (1290 gramas) da espécie *A. zerumbet* foram obtidas no Horto de Plantas Medicinais Professor Francisco José de Abreu Matos (HPMAM) (3°44'44.9"S 38°34'39.2"W) localizado no Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza – Ceará. A confirmação da identidade botânica do vegetal foi realizada no Herbário Prisco Bezerra (EAC) do Departamento de Biologia da UFC, onde foi depositada uma exsicata registrada sob a codificação EAC-56851.

2.2 Extração e Caracterização Fitoquímica do Óleo Essencial

O óleo essencial foi obtido por meio de técnica de arraste à vapor d'água, em extrator do tipo Clevenger a partir das folhas frescas da *A. zerumbet*, conforme descrito por Craveiro (1981), com modificações. Em seguida, o óleo essencial de *A. zerumbet* coletado foi pesado com vistas ao cálculo de rendimento (p/p) e armazenado em temperatura de -20°C.

Os constituintes do óleo essencial foram analisados no Parque de Desenvolvimento Tecnológico da (PADETEC) da UFC por meio de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM), utilizando aparelho SHIMADZU, CG/EM-QP 2010. Os componentes do óleo essencial de *A. zerumbet* foram identificados por meio de espectros de massas disponíveis em bancos de dados (NIS21 e NIS107) e pela comparação dos índices de retenção obtidos experimentalmente com os disponíveis na literatura (ADAMS, 2007).

2.3 Desenho de fitoconstituintes para análises *in silico*

Os constituintes químicos identificados por CG/EM referentes ao óleo essencial de *A. zerumbet* foram desenhados separadamente por meio do software ACD/ChemSketch (Freeware) versão 2019.2.2, e os arquivos referentes a cada molécula foram salvos com a extensão .mol. Cada um dos fitoconstituintes foi otimizado de acordo com parâmetros moleculares adaptados de mecânica clássica (SANTOS et al., 2018). ~

2.4 Avaliação do potencial farmacológico dos fitoconstituintes identificados

Os arquivos a extensão .mol previamente gerados foram inseridos através da opção “Get Prediction” do servidor online gratuito PASS Online (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline>). O software fornece os resultados da análise na forma de dois índices principais: “Pa” (probabilidade de uma substância ser biologicamente ativa) e “Pi” (probabilidade de uma substância não ser biologicamente ativa) (FILIMOV et al., 2014).

Os índices Pa e Pi foram calculados automaticamente para todas as atividades biológicas disponíveis na ferramenta. Entretanto, após a obtenção dos resultados, foram selecionadas as ações biológicas de relevante caráter antimicrobiano, classificadas e organizadas em três grupos principais, a saber: antiviral (anti-Influenza, anti-Picornavírus, anti-Rinovírus, anti-Herpes, anti-Citomegalovírus (CMV) e inibidora da protease 3C-like), antibacteriana (antibacteriana, antimicobacteriana, inibidora da beta-lactamase e inibidora da lisostafina) e antifúngica (antifúngica, inibidora de esqualeno epoxidase, inibidora da 1,3-beta-glucano sintase, inibidora da quitina sintase e inibidora da lanosterol 14 alfa-desmetilase).

2.5 Predição de absorção intestinal e penetração cerebral por meio de Modelo BOILED-EGG

Os arquivos na extensão .mol foram submetidos a análise por meio da ferramenta BOILED-Egg (Brain Or IntestinaL EstimateD Permeation Predictive Model), disponível na plataforma online gratuita SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>), o qual permite estimar a absorção intestinal passiva (HIA) e a permeação de pequenas moléculas através da barreira hematoencefálica (BBB) (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017). Além disso, a ferramenta possibilita prever se um composto se trata ou não de um substrato da glicoproteína de permeabilidade (P-gp). A predição é executada por meio de cálculos de correlação entre os valores de Coeficiente de Partição de Wildman (WLOGP) e Área de Superfície Polar Topológica (tPSA) de cada uma das substâncias (DAINA; ZOETE, 2016).

O gráfico BOILED-Egg foi elaborado para o óleo essencial, considerando todos os compostos identificados no registro cromatográfico da amostra.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

As tabelas 1 a 3 discriminam os valores de Pa e Pi relativos à atividade antiviral e antibacteriana e antifúngica de todos os fitoconstituintes do óleo essencial analisado. Conforme evidenciado todas as substâncias apresentam potencial de aplicação contra diferentes tipos de vírus e outros microrganismos.

Substância	Influenza		Picornavírus		Rinovírus		Herpes		CMV		3C-like protease	
	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi
Alfa-pineno	0,432	0,037	0,443	0,08	0,3	0,253	0,348	0,061	0,254	0,072	0,236	0,098
Cineol	0,269	0,113	0,483	0,058	0,322	0,209	0,319	0,078	0,29	0,035	0,216	0,138
4-terpineol	0,264	0,117	0,385	0,123	0,496	0,026	0,347	0,062	0,233	0,104	0	0
Timol	0,454	0,031	0,371	0,136	0,451	0,048	0,366	0,052	0,267	0,056	0,26	0,061
Nerolidol	0,233	0,152	0,352	0,156	0,765	0,001	0,394	0,038	0,566	0,002	0	0
Óxido de Cariofileno	0	0	0	0	0,451	0,048	0,205	0,171	0	0	0	0
Elemol	0	0	0	0	0,336	0,184	0,385	0,042	0,215	0,143	0,221	0,128
Salicilato de Benzila	0,444	0,034	0,486	0,057	0,409	0,082	0,381	0,044	0,319	0,02	0,39	0,004
Astratone	0,386	0,051	0,541	0,035	0,339	0,177	0,384	0,043	0,298	0,03	0,311	0,019

Tabela 1. Avaliação do potencial antiviral dos fitoconstituintes do óleo essencial de *A. zerumbet*

Fonte: Autores.

Substância	Antibacteriano		Antimicobacteriana		Beta lactamase inhibitor	
	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi
Alfa-pineno	0,326	0,051	0,189	0,188	0,101	0,094
Cineol	0,298	0,061	0	0	0,099	0,098
4-terpineol	0,328	0,05	0,233	0,136	0	0
Timol	0,336	0,047	0,473	0,023	0,133	0,054
Nerolidol	0,462	0,02	0,296	0,083	0	0
Óxido de Cariofileno	0,532	0,014	0,251	0,119	0	0
Elemol	0,474	0,019	0,434	0,031	0	0
Salicilato de Benzila	0,339	0,046	0,471	0,024	0,255	0,009
Astratone	0,35	0,043	0,249	0,12	0,151	0,039

Tabela 2. Avaliação do potencial antibacteriano dos fitoconstituintes do óleo essencial de *A. zerumbet*

Fonte: Autores.

Substância	Antifungal		Squalene epoxidase inhibitor		1,3-Beta-glucan synthase inhibitor		Chitin synthase inhibitor		Lanosterol 14 alpha demethylase inhibitor	
	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi
Alfa-pineno	0,439	0,042	0,106	0,068	0,043	0,043	0,138	0,078	0	0
Cineol	0,214	0,128	0,101	0,078	0	0	0,126	0,096	0,125	0,063
4-terpineol	0,107	0,047	0,097	0,089	0,045	0,041	0	0	0,123	0,067
Timol	0,464	0,037	0,151	0,013	0,05	0,034	0,164	0,051	0,14	0,04
Nerolidol	0,635	0,015	0,188	0,004	0,051	0,033	0	0	0,134	0,047
Óxido de Cariofileno	0,647	0,014	0	0	0,084	0,016	0	0	0	0
Elemol	0,617	0,017	0	0	0,06	0,026	0	0	0,122	0,07
Salicilato de Benzila	0,379	0,055	0,173	0,005	0	0	0,231	0,022	0,175	0,015
Astratone	0,362	0,059	0,151	0,013	0	0	0,232	0,021	0,149	0,031

Tabela 3. Avaliação do potencial antifúngico dos fitoconstituintes do óleo essencial de *A. zerumbet*

Fonte: Autores.

Quando o P_a é maior que 0,7, existe alta probabilidade da molécula em análise apresentar ação biológica experimentalmente, porém a referida molécula pode se tratar de um análogo estrutural próximos de fármacos tradicionais. Se o valor de P_a for situado entre 0,7 e 0,5, existem menores chances de se detectar atividade biológica durante os ensaios pré-clínicos, mas maior chance de se tratar de uma molécula protótipo para uma nova classe de drogas. Para moléculas com P_a inferior a 0,5, e P_a superior ao valor de P_i , existem baixas chances da substância apresentar ação biológica mas se a previsão for confirmada, o composto encontrado poderá ser um composto protótipo para uma nova classe química para a atividade biológica em estudo. (FILIMONOV *et al.*, 2014).

Como apresentado nas tabelas, vários podem ser os alvos de atividade relacionados aos constituintes do óleo essencial de *A. zerumbet*, como a 3C-like protease (3CLpro), que sé uma proteína essencial para a replicação de diferentes tipos de coronavírus, incluindo o SARS-CoV-2, sendo considerada um importante alvo em investigações de agentes terapêuticos para a COVID-19 (LIU *et al.*, 2020).

Além disso, outros alvos são enzimas bacterianas e fúngicas essenciais nos mecanismos de resistência, tais como as beta-lactamases, que catalisam a quebra do anel beta-lactâmico presente nas estruturas de diversos antimicrobianos como penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos (WATKINS *et al.*, 2013). Já relacionado a possível atividade antifúngica, alvos potenciais são moléculas relacionadas a manutenção das estruturas de membrana e parede celular, tais como Esqualeno epoxidase e lanosterol 14 α -demetilase, enzimas estas necessárias ao metabolismo do ergosterol. Outros alvos são 1,3-beta-glucano sintase e a quitina sintase, importantes constituintes das paredes celulares fúngicas, sendo esta última não encontrada em fungos e animais, o que acaba se tornando um alvo promissor para o desenvolvimento de fármacos de ação antifúngica (CHAUDHARY; TUPE; DESHPANDE, 2013).

Com relação a predição de absorção intestinal e penetração cerebral por meio de Modelo BOILED-EGG para os constituintes do óleo essencial de *A. zerumbet*.

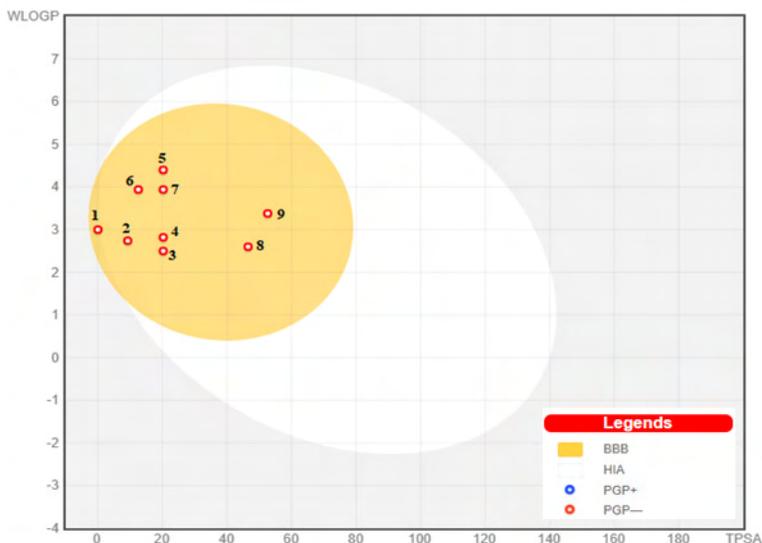


Figura 1. Modelo BOILED-Egg para fitoconstituintes do óleo essencial de *A. zerumbet*

Fonte: Autores

As substâncias que aparecem na zona branca são as que possuem maior probabilidade de serem absorvidas pelo trato gastrointestinal, enquanto as que aparecem sob a zona amarela são as moléculas que possuem maior probabilidade de permear-se até o tecido cerebral. Moléculas plotadas na área cinza possuem dificuldades de absorção (DAINA; ZOETE, 2016). Como apresentado na figura 1, os constituintes do óleo essencial de *A. zerumbet* tem maior probabilidade de permearem até os tecidos cerebrais, o que pode justificar a potencial atividade em distúrbios neurológicos presente nos óleos de plantas do gênero *Alpinia* (GHOSH & RANGAN, 2013).

Apesar de óleos essenciais serem capazes de alterar estrutura das membranas e conseqüentemente se ligarem a glicoproteína P (gp-P), ocasionando o processo de resistência a muitos fármacos, o óleo essencial de *A. zerumbet* não é capaz de se ligar a gp-P (pontos em vermelho na figura 1), de acordo com a predição realizada, o que pode vir a ser um ponto de interessante abordagem visto que fármacos que se ligam a gp-P são chamados quimiossensibilizadores, pois estes podem ser utilizados em conjunto a outros medicamentos com baixa especificidade de ligação a gp-P, fazendo com que estes permaneçam no interior das células quando o quimiossensibilizador é retirado da célula pelo transportador (KOSMO, 2017).

4 | CONCLUSÃO

Portanto, de acordo com as análises realizadas através das ferramentas

computacionais descritas, o óleo essencial de *Alpinia zerumbet* é um potencial alvo farmacológico por ter apresentado em estudos *in sílico* potenciais atividades antiviral, antibacteriana e antifúngica, podendo ser potencialmente utilizadas em desordens neurológicas, visto que os componentes do óleo são capazes de penetrar os tecidos cerebrais, e como quimiossensibilizadores atuando em conjunto com outros fármacos.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Allured Pub Corp. Ed. 4, 2007. 804p.

AKKARI, Alessandra Cristina Santos *et al.* Inovação tecnológica na indústria farmacêutica: diferenças entre a Europa, os EUA e os países farmaemergentes. **Gestão & Produção**, [S.L.], v. 23, n. 2, p. 365-380, 14 jun. 2016.

CARDOSO, Rebeca Sales. **Desenvolvimento de técnicas farmacêuticas para obtenção da droga vegetal a partir das folhas de erva-cidreira (*Lippia alba* (Mill.) NE Brown) quimiotipo II**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza- CE, 2016.

CHAN, Eric Wei Chiang; WONG, Siu Kuin; CHAN, Hung Tuck. *Alpinia zerumbet*, a ginger plant with a multitude of medicinal properties: an update on its research findings. **Journal Of Chinese Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 26, n. 11, p. 775-788, 30 nov. 2017. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*.

CHAUDHARY, Preeti M.; TUPE, Santosh G.; DESHPANDE, Mukund V.. Chitin Synthase Inhibitors as Antifungal Agents. **Mini Reviews In Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 222-236, 1 fev. 2013.

CRAVEIRO, A. A. *et al.* **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza: UFC, 1981.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, p. 42717, 2017.

DAINA, A.; ZOETE, V. A boiled-egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules. **ChemMedChem**, v. 11, n. 11, p. 1117, 2016.

DHINGRA, Sameer *et al.* Microbial Resistance Movements: an overview of global public health threats posed by antimicrobial resistance, and how best to counter. **Frontiers In Public Health**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1-22, 4 nov. 2020.

FILIMONOV, D. A. *et al.* Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the PASS online web resource. **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, v. 50, n. 3, p. 444-457, 2014.

FINATTO, Luis Junior. **Aplicabilidade da matriz raci no cenário da unidade de pesquisa clínica do hospital universitário de santa maria**. 2018. 140 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica, Hospital das Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

GHOSH, S.; RANGAN, L. **Alpinia: the gold mine of future therapeutics**. 3 *Biotech*, v. 3, n. 3, p. 173–185, 1 jun. 2013.

GOYAL, Megh R. *et al.* **The therapeutic properties of medicinal plants: health-rejuvenating bioactive compounds of native flora**. Burlington: Apple Academic Press, 2020. 360 p.

KOSMO, Daniele de Fatima. **AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA FASE VAPOR DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Jasminum officinale* EM CALU-3 (ADENOCARCINOMA DE PULMÃO) E 3T3 (FIBROBLASTOS)**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2017.

LEWIS, Kim. Platforms for antibiotic discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.L.], v. 12, n. 5, p. 371-387, 30 abr. 2013.

LIU, J.; BALASUBRAMANIAN, M.. 1,3-beta-Glucan Synthase: a useful target for antifungal drugs. **Current Drug Target -Infectious Disorders**, [S.L.], v. 1, n. 2, p. 159-169, 1 ago. 2001.

LIU, Yuzhi *et al.* The development of Coronavirus 3C-Like protease (3CLpro) inhibitors from 2010 to 2020. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 206, p. 112711, nov. 2020.

LORENZI, H.; MATOS, F.J. A. M. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 544p

MAGALHÃES, Karla do Nascimento; BANDEIRA, Mary Anne Medeiros; MONTEIRO, Mirian Parente. **Plantas medicinais da caatinga do Nordeste brasileiro: etnofarmacopeia do professor francisco José de abreu matos**. Fortaleza: Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará, 2020. 253 p.

MILLEZI, A. F. *et al.* Caracterização química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 18-24, mar. 2014.

MONK, Brian C. *et al.* Fungal Lanosterol 14 α -demethylase: a target for next-generation antifungal design. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Proteins And Proteomics**, [S.L.], v. 1868, n. 3, p. 1-19, mar. 2020.

PADYANA, Anil K. *et al.* Structure and inhibition mechanism of the catalytic domain of human squalene epoxidase. **Nature Communications**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-10, 9 jan. 2019.

TESCHKE, Rolf; XUAN, Tran. Viewpoint: a contributory role of shell ginger (*alpinia zerumbet*) for human longevity in okinawa, Japan?. **Nutrients**, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 166, 31 jan. 2018.

TIAN, Sheng *et al.* The application of in silico drug-likeness predictions in pharmaceutical research. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 86, p. 2-10, jun. 2015.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: causes and threats. **Pharmacy and Therapeutics Journal**, v. 40, p. 277–283, 2015.

VICTAL, J. C. *et al.* Métodos alternativos in vitro e in silico: métodos auxiliares e substitutivos à experimentação animal. **RevInter**, v. 7, n. 2, p. 57-36, 2014.

WANG, Yulan *et al.* In silico ADME/T modelling for rational drug design. **Quarterly Reviews Of Biophysics**, [S.L.], v. 48, n. 4, p. 488-515, 2 set. 2015.

WATKINS, Richard R. *et al.* Novel β -lactamase inhibitors: a therapeutic hope against the scourge of multidrug resistance. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 4, n. 24, p. 1-8, dez. 2013.

WU, Zengrui *et al.* In silico prediction of chemical mechanism of action via an improved network-based inference method. **British Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 173, n. 23, p. 3372-3385, 1 nov. 2016.

ZHANG, Ruihan *et al.* Machine learning approaches for elucidating the biological effects of natural products. **Natural Product Reports**, [S.L.], v. 38, n. 2, p. 346-361, 2021.

CAPÍTULO 6

PRINCIPAIS MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS NA FERMENTAÇÃO DE ALIMENTOS

Data de aceite: 01/11/2021

Taynara Ellen Romero Batistela

Departamento de Bioquímica e Biotecnologia,
Universidade Estadual de Londrina
Londrina-Paraná

Dâmaris Cristine Landgraf

Departamento de Bioquímica e Biotecnologia,
Universidade Estadual de Londrina
Londrina-Paraná

Daniele Cassiano Feliciano

Departamento de Biologia Geral, Universidade
Estadual de Londrina
Londrina-Paraná

Sara Mataroli de Godoy

Departamento de Biologia Geral, Universidade
Estadual de Londrina
Londrina-Paraná

Daniele Sartori

Departamento de Bioquímica e Biotecnologia,
Universidade Estadual de Londrina
Londrina-Paraná

RESUMO: Alimentos fermentados têm sido utilizados desde a antiguidade, principalmente como forma de preservação dos alimentos. A maioria dos metabólitos produzidos no processo de fermentação de alimentos proporciona benefícios a saúde, em função da atuação de diversos tipos de microrganismos e substratos, sob condições abióticas específicas. Na produção de alimentos fermentados em escala industrial, culturas *starters*, previamente

selecionadas quanto a quantidade e diversidade de microrganismos, são utilizadas. A maioria de tais microrganismos foram inicialmente obtidos da microbiota “in natura” de alimentos e posteriormente selecionados quanto a critérios regulamentados, para serem utilizados como *starters*. Dentre os principais grupos de microrganismos, estão algumas linhagens de bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Atualmente as linhagens de microrganismos selecionados, são utilizadas para fermentação de alimentos de origem animal e vegetal, sob rígidas condições de controle, resultando em alimentos seguros e com qualidade nutricional.

PALAVRAS-CHAVE: Microrganismos, alimentos fermentados, linhagens, bactérias, fungos.

MAIN MICROORGANISMS INVOLVED IN FOOD FERMENTATION

ABSTRACT: Fermented foods have been used since ancient times, mainly as a form of food preservation. Most metabolites produced in the food fermentation process provide health benefits, due to the action of different types of microorganisms and substrates, under specific abiotic conditions. In the production of fermented foods on an industrial scale, starter cultures, previously selected for the quantity and diversity of microorganisms, are used. Most of these microorganisms were initially obtained from the “in natura” microbiota of foods and later selected according to regulated criteria, to be used as starter. Among the main groups of microorganisms are some strains of bacteria, filamentous fungi and yeasts. Currently, selected

strains of microorganisms are used for the fermentation of foods of animal and vegetable origin, under strict control conditions, resulting in safe foods with nutritional quality.

KEYWORDS: Microorganisms, fermented foods, strains, bacteria, fungi

PRINCIPAIS ASPECTOS ENVOLVIDOS NA FERMENTAÇÃO DE ALIMENTOS

A fermentação é um dos métodos mais antigos e econômicos de produção e preservação de alimentos, originados há mais de 4000 anos com a produção do vinho e do leite fermentado (MINAMIYAMA et al., 2003). A palavra fermentação, do latim *fervere*, foi definida por Louis Pasteur como “La vie sans l’air” (vida sem ar). De forma ampla, a prática de fermentação consiste “na transformação dos alimentos, por diferentes microrganismos e os metabólitos que eles produzem” (KATZ, 2012).

Desde a antiguidade, é conhecido que os alimentos fermentados podem oferecer benefícios nutricionais, de saúde e segurança alimentar (LICANDRO et al., 2020; NOUT, 2014; TAMANG et al., 2016). Acerca dos benefícios proporcionados pelo processo fermentativo, tem-se a identificação dos microrganismos que teve início em 1665 por Van Leeuwenhoek e Hooke (GEST, 2004).

Com o decorrer dos anos as práticas de fermentação foram evoluindo a partir dos alimentos disponíveis, das condições climáticas, dos aspectos sociais, culturais, religiosos e econômicos de cada região (NIELSEN, 2019) e favorecendo algumas comunidades microbianas, responsáveis pela segurança, textura, sabor e aroma desses alimentos fermentados (WOLFE e DUTTON, 2015).

Sendo assim, a síntese de metabólitos produzidos no processo de fermentação, requer condições específicas de crescimento do microrganismo, substratos, temperatura, pH, agitação, presença ou ausência de oxigênio entre outras (ALARCON e SHENE, 2021). Os microrganismos ao utilizarem os componentes contidos nos alimentos, como por exemplo, amido – glicose, produzem energia para seu desenvolvimento e consequente alteração da textura, funcionalidade e propriedades sensoriais dos alimentos (MASOOD et al., 2011).

Neste contexto, os alimentos fermentados passaram a ganhar destaque, devido a biodisponibilidade de nutrientes aliados à qualidade nutricional e ao potencial de promoção da saúde, além de intensidade do sabor (SHIBY e NISHA, 2013; ZHENG et al., 2021). Compostos funcionais presentes em frutas, vegetais e ervas podem ser transformados em compostos bioativos, pela fermentação, podendo apresentar atividades antioxidantes e nutrientes em quantidades consideravelmente maiores que os encontrados em alimentos *in natura* (GUMIENNA et al., 2016; HUSSAIN et al., 2016; ZHANG et al., 2017; BUENROSTRO-FIGUEROA et al., 2019).

Dentre as propriedades funcionais proporcionada pelos compostos bioativos produzidos por microrganismos em alimentos fermentados, tem-se as propriedades

probióticas, antimicrobianas, antioxidantes, degradação de compostos não nutritivos entre outras (CHÁVARRI et al., 2010; MEIRA et al., 2012; PING et al., 2012; PERNA et al., 2013; HILL et al., 2014; OMOLARA, 2014).

Os compostos bioativos produzidos na fermentação são dependentes do tipo de alimento fermentado e dos microrganismos que participam do processo. Estão entre os compostos bioativos, algumas vitaminas, como vitamina A, vitamina C, vitamina K, compostos sulfurados como indol-3-carbinol e alicina, enzimas como *superóxido dismutase* e *natoquinase* entre outros (LIM e IM, 2009; KWAK et al., 2014; HAN et al., 2015; NAGAI, 2015; ASTUTI, 2015).

Por outro lado, metabólitos indesejáveis e que trazem perigo quanto à segurança dos alimentos fermentados, também podem ser produzidos durante a fermentação, a depender do microrganismo ou conjunto de microrganismos utilizados no processo. Entre os principais compostos estão as aminas biogênicas, nitrosaminas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e as micotoxinas (LAWAL, 2017; ELIAS, LARANJO e FRAQUEZA 2018; AFUM et al., 2018; LARANJO et al., 2019).

Com o propósito de regulamentar a produção e disponibilização de alimentos fermentados com segurança, tem-se a atuação dos órgãos de regulamentação. Estes órgãos responsáveis pela regulamentação de alimentos fermentados levam em consideração os microrganismos utilizados no processo e os compostos e ou ingredientes derivados da fermentação. No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) são responsáveis pela regulamentação voltadas aos alimentos, sendo o MAPA o órgão destinado aos alimentos fermentados.

MICRORGANISMOS SELECIONADOS PARA FERMENTAÇÃO DE ALIMENTOS

A fermentação industrial de alimentos é conduzida com culturas iniciais de microrganismos denominadas de *starters*, podendo ser constituída de uma mistura de microrganismos ou até mesmo por uma única linhagem de microrganismo, previamente selecionados (HOLZAPFEL et al., 2003; BRANDT et al., 2014).

Alguns gêneros, espécies e linhagens de microrganismos são preferencialmente utilizados como culturas *starters* na fermentação de alimentos, podendo haver variação da quantidade e diversidade de espécies microbianas (BOURDICHON et al., 2012; TAMANG et al., 2016). A diversidade de microrganismos envolvidos na fermentação de alimentos é altamente dependente da origem do produto alimentar e das condições abióticas em que a fermentação ocorre. A associação entre os fatores bióticos e abióticos conseqüentemente irá influenciar na composição, qualidade e propriedades organolépticas, do produto final fermentado.

Os microrganismos preferencialmente utilizados como culturas *starters*, geralmente são isolados da microbiota nativa de alimentos, por apresentarem adaptação às condições

ambientais dos alimentos, por serem capazes de controlar a deterioração dos alimentos e por controlar a presença da microbiota patogênica (PEREIRA et al., 2020).

Ainda quanto a seleção de microrganismos a serem utilizados como cultura *starter*, deve ser considerado alguns critérios, como: estudo de seu metabolismo, seu reconhecimento como seguro, sua viabilidade e estabilidade em larga escala e durante o armazenamento (DIÉZ et al., 2013).

Com o decorrer do tempo, alguns grupos de microrganismos (bactérias e fungos) foram previamente selecionados e utilizados como *starters* em processos de fermentação. Segundo Bourdichon et al. (2012), dentre os principais grupos de microrganismos utilizados em processos de fermentação de alimentos, tem-se os filios *Actinobacteria*, espécies *Actinobacteria - Firmicutes* e espécies *Firmicutes – Proteobacteria*.

O filo *Actinobacteria* é representado por algumas espécies dos gêneros *Bifidobacterium*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Brachybacterium*, *Microbacterium*, *Arthrobacter*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Propionibacterium* e *Streptomyces*. O filo que contém espécies *Actinobacteria – Firmicutes* é representado por algumas espécies dos gêneros, *Bacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Macrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Lactococcus*. Enquanto que, o filo denominado espécies *Firmicutes – Proteobacteria* é representado por espécies dos gêneros *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Hafnia*, *Halomonas* e *Zymomonas*

Quanto aos fungos utilizados em fermentação de alimentos, tem-se representantes pertencentes aos filios *Ascomycota*, *Basidiomycota* e *Zygomycota*. Estes filios são representados por algumas espécies dos gêneros, *Lecanicillium*, *Geotrichum*, *Yarrowia*, *Galactomyces*, *Scopulariopsis*, *Fusarium*, *Candida*, *Cyberlindnera*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Hanseniaspora*, *Kazachstania*, *Kluyveromyces*, *Lachancea*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schwanniomyces*, *Starmerella*, *Trigonopsis*, *Wickerhamomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Zygorulasporea*, *Kluyveromyces*, *Torulasporea*, *Schizosaccharomyces*, *Neurospora*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cystogilobasidium*, *Guehomyces*, *Mucor* e *Rhizopus*.

As espécies/linhagens selecionadas têm sido utilizadas no processo de fermentação para produção de alimentos fermentados como: coalhadas, iogurtes, queijos, kefir, kimchi, tempeh, natto, missô, chucrutes, cervejas, kombuchás, salames entre outros. Tais microrganismos utilizam substratos originários de laticínios como leite e caseína do leite, de fontes cárneas e de fontes vegetais como, soja, repolho, gengibre, alho, pepino, brócolis, rabanete, trigo, milho, sorgo, arroz e uvas (MARCO et al., 2017; SHARMA et al., 2020).

Embora a utilização de microrganismos em processo de fermentação industrial leva à perda da biodiversidade natural dos alimentos, a utilização de microrganismos selecionados para fermentação é de extrema importância. O rígido controle do processo de fermentação de alimentos e metabolitos produzidos, a partir de linhagens selecionadas e seguras, contribui com a preservação dos alimentos e com incremento da qualidade

nutricional.

REFERÊNCIAS

AFUM C.; CUDJOE, L.; HILLS, J.; HUNT, R.; PADILLA, L. A.; ELMORE, S.; AFRIYIE, A.; OPARE-SEM, O.; PHILLIPS, T.; JOLLY, P.E. Association between aflatoxin M1 and liver disease in HBV/HCV infected persons in Ghana. **Environmental Research and Public Health**.v. 13, n. 4, p. 377, 2016.

ALARCON, C.; SHENE, C. Fermentation 4.0, a case study on computer vision, soft sensor, connectivity, and control applied to the fermentation of a thraustochytrid. **Computers in Industry**, v. 128, p. 103431, 2021.

ASTUTI, M. Health benefits of tempe. **Health Benefits of Fermented Foods**. 1 ed. New York, NY: CRC Press, 371-394, 2015.

BOURDICHON, F.; CASAREGOLA, S.; FARROKH, C.; FRISVAD, J.C.; GERDS, M.L.; HAMMES, W.P.; HARNETT J.; HUYS, G.; LAULUND, S.; OUWEHAND, A.; POWELL, I.B.; PRAJAPATI, J.B.; SETO, Y.; SCHURE, E.T.; BOVEN, A.V.; VANKERCKHOVEN, V.; ZGODA, A.; TUIJELAARS, S.; HANSEN, E.B. Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. **International Journal of Food Microbiology**. V. 154, p. 87–97, 2012.

BRANDT, M.J. Starter cultures for cereal based foods. **Food in Microbiology**, v. 37, p. 41-43, 2014.

BUENROSTRO-FIGUEROA, J. J.; VELÁZQUEZ, M.; FLORES-ORTEGA, O.; ASCACIO-VALDÉS, J. A.; HUERTA-OCHOA, S.; AGUILAR, C. N.; PRADO-BARRAGÁN, L. A. Solid state fermentation of fig (*Ficus carica* L.) by-products using fungi to obtain phenolic compounds with antioxidant activity and qualitative evaluation of phenolics obtained. **Process Biochemistry**, v. 62, p. 16-23, 2017.

CHÁVARRI, M.; MARAÑÓN, I.; ARES, R.; IBÁÑEZ, F. C.; MARZO, F.; DEL CARMEN VILLARÁN, M. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, p. 185-189, 2010.

DIÉZ, J.G.; PATARATA, L. Behavior of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in chouriço de vinho, a dry fermented sausage made from wine-marinated meat. **Journal of Food Protection**, v. 76, p. 588-594, 2013.

ELIAS, M.; FRAQUEZA, M.J.; LARANJO, M. Biogenic amines in food: presence and control measures. **Biogenic Amines (BA): Origins, Biological Importance and Human Health Implications**. 1 ed. New York, NY. Nova Science Publishers. p. 129–176, 2018.

GEST, H. The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni Van Leeuwenhoek, fellows of the Royal Society. **Notes and Records of the Royal Society of London**, v. 58, n. 2, p. 187-201, 2004.

GUMIENNA, M.; SZWENGIEL, A.; GÓRNA, B. Componentes bioativos da fruta da romã e sua transformação por processos de fermentação. **European Food Research and Technology**, v. 242, n. 5, p. 631-640, 2016.

HAN, E.S.; KIM, H.J.; CHOI, H.K. Health Benefits of Kimchi. **Health Benefits of Fermented Foods**, 1. ed. New York, NY. CRC Press. p. 343–370, 2015.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G.R.; MERENSTEIN, D.J.; POT, B. MORELLI, L.; CANANI, R.B.; FLINT, H.J.; SALMINEN, S.; CALDER, P.C.; SANDERS, M.R. Expert consensus document. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, p. 506–514, 2014.

HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U.; GEISEN, R.; LÜCKE, F.-K. Starter and protective cultures. **Food Preservatives**. 1 ed. Boston, MA. Springer, p. 291–320, 2003.

HUSSAIN, A.; BOSE, S.; WANG, J.H.; YADAV, M.K.; MAHAJAN, G.B.; KIM, H. Fermentation, a feasible strategy for enhancing bioactivity of herbal medicines. **Food Research International**, v. 81, p. 1-16, 2016.

KATZ, S.E. The Art of Fermentation: An In-depth Exploration of Essential Concepts and Processes from Around the World. **Chelsea Green Publishing**, Vermont, 2012.

KWAK, S.H.; CHO, Y.M.; NOH, G.M.; OM, A.S. Cancer preventive potential of Kimchi lactic acid bacteria (*Weissellacibaria*, *Lactobacillus plantarum*). **Journal of Cancer Prevent**. v. 19, p. 253–258, 2014.

LARANJO, M.; POTES, M.E.; E, M. Role of starter cultures on the safety of fermented meat products. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 853, 2019.

LAWAL, A. T. Polycyclic aromatic hydrocarbons. A review. **Cogent Environmental Science**, v. 3, p. 1339841, 2017.

LICANDRO, H.; HO, P.H.; NGUYEN, T.K.C.; PETCHKONGKAEW, A.; VAN NGUYEN, H.; CHU-KY, S.; WACHÉ, Y. How fermentation by lactic acid bacteria can address safety issues in legumes food products? **Food Control**, v. 110, p. 106957, 2020.

LIM, S. M.; IM, D.S. Screening and characterization of pro biotic lactic acid bacteria isolated from Korean fermented foods. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p.178-186, 2009.

MARCO, M. L.; HEENEY, D.; BINDA, S.; CIFELLI, C. J.; COTTER, P. D.; FOLIGNÉ, B.; HUTKINS, R. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 44, p. 94-102, 2017.

MASOOD, M. I.; QADIR, M. I.; SHIRAZI, J. H.; KHAN, I. U. Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 91-98, 2011.

MEIRA, S.M.M.; DAROIT, D. J.; HELFER, V. E.; CORRÊA, A.P.F.; SEGALIN, J.; CARRO, S.; BRANDELLI, A. Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay. **Food Research International**, v. 48, p. 322-329, 2012.

MINAMIYAMA, Y.; AKEMURA, S.; YOSHIKAWA, T.; OKADA, S. Fermented grain products, production, properties and benefits to health. **Pathophysiology**. v. 9, n. 4, p. 221-227, 2003.

NAGAI, T. Health benefits of Natto, **Health Benefits of Fermented Foods**. 1 ed. New York, NY, CRC Press, p. 433–453, 2015.

NIELSEN, J. Yeast systems biology: model organism and cell factory. **Biotechnology Journal**, v. 14, n. 9, p. 1800421, 2019.

NOUT, M. J. R. Food technologies: fermentation. **Encyclopedia of Food Safety, Volume 3: Foods, Materials, Technologies and Risks**. p. 168-177. Academic Press, 2014.

OMOLARA, B. O. Cyanide content of commercial gari from different areas of Ekiti State, Nigeria. **World Journal of Nutrition and Health**, v. 2, p. 58-60, 2014.

PEREIRA, G.V.M.; DE CARVALHO NETO, D.P.; JUNQUEIRA, A.C.D.O.; KARP, S.G.; LETTI, L.A. MAGALHÃES JUNIOR, A.I.; SOCCOL, C.R. A review of selection criteria for starter culture development in the food fermentation industry. **Food Reviews International**, v. 36, p. 135-167, 2020.

PERNA, A.; INTAGLIETTA, I.; SIMONETTI, A.; GAMBACORTA, E. Effect of genetic type and casein haplotype on antioxidant activity of yogurts during storage. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 3435-3441, 2013.

PING, P.; SHIH, C.; RONG, T.; KING, Q. Effect of isoflavone aglycone content and antioxidation activity in natto by various cultures of *Bacillus subtilis* during the fermentation period. **Nutrition & Food Sciences**, 2012.

SHARMA, R.; GARG, P.; KUMAR, P.; BHATIA, S. K.; KULSHRESTHA, S. Microbial fermentation and its role in quality improvement of fermented foods. **Fermentation**, v. 6, p. 106, 2020.

SHIBY, V. K.; MISHRA, H. N. Fermented milks and milk products as functional foods - A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 5, p. 482-496, 2013.

TAMANG, J. P.; SHIN, D.; JUNG, S.; CHAE, S. Functional properties of microorganisms in fermented foods. **Frontiers In Microbiology**, v. 7, p. 1-13, 2016.

WOLFE, B. E.; DUTTON, R. J. Fermented foods as experimentally tractable microbial ecosystems. **Cell**, v. 161, p. 49-55, 2015.

ZHANG, X. Y.; CHEN, J.; LI, X. L.; YI, K.; YE, Y.; LIU, G.; WANG, Z. G. Dynamic changes in antioxidant activity and biochemical composition of tartary buckwheat leaves during *Aspergillus niger* fermentation. **Journal of Functional Foods**, v. 32, p. 375-381, 2017.

ZHENG, Y.; LI, L.; JIN, Z.; AN, P.; YANG, S.T.; FEI, Y.; LIU, G. Characterization of fermented soymilk by *Schleiferilactobacillus harbinensis* M1, based on the whole-genome sequence and corresponding phenotypes. **LWT - Food Science and Technology**, v.144, p.111237, 2021.

QUALIDADE HIGIÊNICO SANITÁRIA E FÍSICO-QUÍMICA DA CASTANHA-DO-BRASIL E SEUS DERIVADOS COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE CHAPECÓ - SC

Data de aceite: 01/11/2021

Data de submissão: 20/09/2021

Daniela Varnier

Universidade Comunitária da Região de
Chapecó
Chapecó - Santa Catarina
<http://lattes.cnpq.br/6872324947608527>

Filomena Marafon

Universidade Federal da Fronteira Sul
Chapecó - Santa Catarina
<http://lattes.cnpq.br/4162595115695526>

Débora Carneiro Leite

Universidade Comunitária da Região de
Chapecó
Chapecó - Santa Catarina
<http://lattes.cnpq.br/3312706928427501>

RESUMO: Devido as suas propriedades benéficas, as oleaginosas estão cada vez mais presentes na dieta dos brasileiros, desta forma analisar a qualidade microbiológica deste produto e seus derivados torna-se extremamente importante. O presente trabalho avaliou oito amostras de castanha-do-brasil comercializadas *in natura* e oito marcas de barras de cereais que continham a castanha em sua composição. As amostras foram adquiridas na cidade de Chapecó-SC. Avaliou-se os parâmetros microbiológicos de coliformes totais e termotolerantes - *Escherichia coli*, bactérias mesófilas aeróbias e, bolores e leveduras, além dos parâmetros físico-químicos de umidade e cinzas. Os resultados encontrados

indicaram que os produtos analisados atendem a legislação para coliformes totais e termotolerantes, para mesófilos, onde os valores variaram de $2,0 \times 10^1$ UFC/g à $1,4 \times 10^2$ UFC/g para as barras de cereais, e de $<1,0 \times 10^1$ à $4,7 \times 10^3$ UFC/g para castanhas. Para bolores e leveduras obtivemos resultados de $<1,0 \times 10^1$ UFC/g à $1,3 \times 10^1$ UFC/g para as barras de cereais, e de $<1,0 \times 10^1$ à $9,0 \times 10^1$ UFC/g para castanhas. Desta forma as barras de cereais e as amostras de castanha-do-brasil analisadas neste trabalho atenderam às determinações da RDC nº12/2001 (ANVISA), porém ressalta-se a importância da avaliação de bolores e leveduras, que apesar de não compreender um parâmetro de análise pela legislação constitui um protocolo importante, pois os mesmos podem ocasionar problemas à saúde, devido a produção de micotoxinas. Para os parâmetros físico-químicos, os valores de umidade encontram-se dentro da legislação e os resultados de cinzas apresentam valores elevados, sendo atribuídos a alta concentração de minerais nas oleaginosas.

PALAVRAS-CHAVE: Avaliação microbiológica; avaliação físico-química; barras de cereais.

HYGIENIC, SANITARY AND PHYSICAL-CHEMICAL QUALITY OF CASTANHA-DO-BRASIL AND ITS COMMERCIALIZED DERIVATIVES IN THE CITY OF CHAPECÓ - SC

ABSTRACT: Due to their beneficial properties, oilseeds are increasingly present in the Brazilian diet, so analyzing the microbiological quality of this product and its derivatives becomes extremely important. The present study evaluated

eight samples of brazil nuts commercialized in natura and eight brands of cereal bars that contained the chestnut in its composition. The samples were purchased in the city of Chapecó-SC. Microbiological parameters of total and thermotolerant coliforms - *Escherichia coli*, aerobic mesophilic bacteria and molds and yeasts, as well as physical and chemical parameters of moisture and ash were evaluated. The results found comply with the legislation for total and thermotolerant coliforms for mesophiles, values ranged from 2.0×10^1 UFC / g to 1.4×10^2 UFC / g for cereal bars, and from $<1.0 \times 10^1$ to 4.7×10^3 CFU / G for nuts. For molds and yeasts we obtained results of $<1.0 \times 10^1$ CFU / g at 1.3×10^1 CFU / g for cereal bars, and from $<1.0 \times 10^1$ to 9.0×10^1 CFU / g for nuts. In this way, the cereal bars and the Brazil nut samples analyzed in this study met the requirements of RDC nº12 / 2001 (ANVISA), but the importance of the evaluation of molds and yeasts is highlighted, due to the results found in this work and The problems that can cause health, since they are directly related to the production of mycotoxins. For the physico-chemical parameters, the values of humidity are within the legislation and the ash results have high values, being attributed to a high concentration of minerals in the oilseeds.

KEYWORDS: Microbiological evaluation; Physicochemical evaluation; Cereal bars.

1 | INTRODUÇÃO

A castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K) é uma espécie arbórea pertencente à família Lecythidaceae. A sua distribuição geográfica é ampla e abrange a Venezuela, Colômbia, Peru, Bolívia e Guiana. Porém, as formações de florestas mais densas ocorrem no Brasil (LORENZI, 2000).

Produz uma amêndoa oleaginosa de elevado valor energético, rica em proteínas de alto valor biológico, minerais como o cálcio, magnésio, ferro, potássio, sódio, entre outros (SOUZA; MENEZES, 2004). Apresenta lipídios de boa qualidade, com altos índices de ácidos graxos insaturados, os quais auxiliam nos processos oxidativos de frações de gorduras prejudiciais ao organismo, como as frações de colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade) (GLÓRIA; REGITANO-d'ÁRCE, 2000; ENRÍQUEZ; SILVA; CABRAL, 2003; SOUZA; MENEZES, 2004).

Essa oleaginosa possui componentes das vitaminas do complexo B1, B2 e B3, podendo ser encontradas as provitaminas A e vitamina E, além do selênio, um antioxidante que vem sendo referido na prevenção de câncer, doenças cardiovasculares, auxiliando nos processos antioxidantes, convertendo compostos tóxicos em atóxicos, resultando na redução da produção em cadeia de radicais livres (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2002; DUTRA-DE-OLIVEIRA, SÉRGIO MARCHINI, 1998; KANNAMKUMARATH; WROBEL; WUILLLOUD, 2004; TEODORO, 2006).

Devido as suas propriedades benéficas, o consumo da castanha-do-brasil tem aumentado nos últimos anos. O seu processamento, inicia-se com a coleta, seguida da etapa de preparo do produto e armazenamento, ainda na área de cultivo. Após a estocagem, segue-se o transporte primário até as sedes dos municípios, e depois o transporte

secundário, até as usinas de beneficiamento, onde, as mesmas serão processadas devendo-se adotar rigoroso controle higiênico-sanitário para manutenção da qualidade microbiológica das amêndoas, que serão posteriormente comercializadas (ENRIQUEZ; SILVA; CABRAL, 2003).

Dentre os principais problemas dos produtos de origem vegetal vendidos *in natura*, ou até mesmo dos produtos processados, cita-se contaminação por microrganismos patogênicos. Sendo necessário a avaliação da qualidade microbiológica do produto, pois a mesma fornece informações que permitem avaliá-lo quanto às condições de processamento, armazenamento e distribuição para o consumo, sua vida útil e qualidade, podendo ainda detectar a provável presença de patógenos, que ocasionam risco à saúde (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), define os padrões microbiológicos para cada alimento. As castanhas e similares possuem parâmetros somente para coliformes a 45 °C e para *Salmonella ssp.*, com no máximo 10^2 UFC.g⁻¹ e ausência em 25 g, respectivamente, não apresentando valores limites para a contagem padrão total e para bolores e leveduras.

O grupo dos coliformes, especialmente representando pela *Escherichia coli*, são microrganismos que revelam a contaminação dos alimentos e causa danos à saúde humana. Contudo, os bolores e as leveduras constituem um grande grupo de microrganismos, que devem ser avaliados, pois são bastante resistentes a condições adversas, como ácido e atividade de água baixa (SILVA et al., 2007). Segundo Rodrigues (2005), altas contagens de bolores e leveduras indicam sanitização pobre no processamento do alimento ou uma seleção mal realizada da matéria-prima, introduzindo produtos contaminados. A alta contagem pode indicar também possível presença de micotoxinas que podem apresentar riscos à saúde.

A preocupação com a qualidade e segurança dos alimentos é uma questão mundial de saúde pública, pelo fato de podermos ingerir algum tipo de alimento contaminado por microrganismos patogênico, toxinas ou micotoxinas (PARIZ, 2011).

Desta forma torna-se muito importante a avaliação microbiológica dos produtos de castanha-do-brasil vendida *in natura* e seus subprodutos comercializados na cidade de Chapecó-SC a fim de avaliá-los quanto a sua qualidade microbiológica.

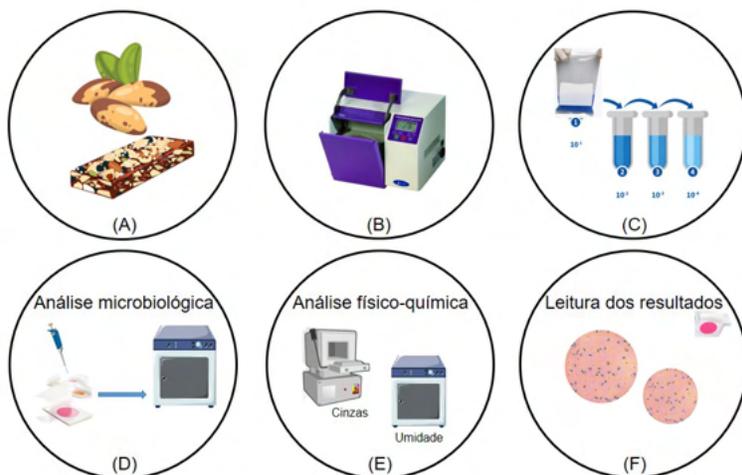
2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras

Foram analisadas oito amostras de castanha-do-brasil *in natura*, adquiridas em oito lojas de produtos naturais localizadas na cidade de Chapecó-SC. Após a aquisição, o estudo prosseguiu com a identificação das amostras, da seguinte forma: C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8.

Foram analisadas 08 amostras de barras de cereais, de diferentes marcas, correspondendo a todas as que foram encontradas contendo castanha-do-brasil, em supermercados na cidade de Chapecó – SC. Após a aquisição as amostras foram identificadas da seguinte forma: B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7 E B8.

A coleta de amostras de castanha-do-brasil *in natura* e de barra de cereais contendo castanha-do-brasil ocorreu no mês de junho de 2016. A Figura 01 representa o desenho experimental da metodologia desse estudo.



Legenda: A Figura 01 representa as etapas executadas no presente estudo. (A) Aquisição de castanhas-do-Brasil e barras de cereal contendo castanha. (B) Preparação da amostra para análise microbiológica, inicialmente pesa-se $25 \pm 0,2$ g e adiciona-se 225 mL de água peptonada e homogeniza-se em *stomacher*. (C) Realiza-se as diluições utilizando água peptonada. (D) Para a análise microbiológica procedeu-se a semeadura em placas *Petrifilm* e incubação em estufa bacteriológica à $35 \pm 1^\circ\text{C}$. (E) Realizou-se as análises físico-químicas avaliando o teor de umidade e cinzas. (F) Procedeu-se a leitura dos resultados.

Figura 1 – Desenho Experimental do Estudo

2.2 Avaliação microbiológica

Foram avaliados, neste trabalho, os parâmetros microbiológicos de coliformes totais, coliformes termotolerantes - *Escherichia coli*, bactérias mesófilas aeróbias e fungos - bolores e leveduras. Para detecção desses microrganismos o método utilizado foi o de petrifilm (3M), conforme protocolo padronizado no laboratório.

As análises foram realizadas com o objetivo de verificar se as amostras atendiam aos padrões microbiológicos estabelecidos pela Resolução RDC nº 12/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, publicada em 10 de janeiro de 2001. Bolores e leveduras também foram determinados, visto serem deteriorantes

potenciais desse tipo de produto.

As análises microbiológicas foram realizadas em julho de 2016, no Laboratório de Microbiologia Básica da Universidade Comunitária da Região de Chapecó-SC.

2.2.1 Preparo das amostras

Antes da abertura das embalagens das amostras, foi realizado o procedimento de desinfecção externa das embalagens com etanol a 70 %. Após esse procedimento, foram pesados assepticamente $25 \pm 0,2$ g de cada uma das amostras em saco estéril. Na sequência foi adicionado assepticamente 225 mL da água peptonada 0,1%, homogeneizou-se por aproximadamente 60 segundos em *stomacher*, sendo está a diluição 10^{-1} .

Desta diluição 10^{-1} foram homogeneizados e transferidos assepticamente 1 mL para 9 mL no tubo de ensaio com água peptonada 0,1% obtendo a diluição 10^{-2} . Posteriormente homogeneizou-se o tubo da diluição 10^{-2} e transferiu-se assepticamente 1 mL para 9 mL no tubo de ensaio com água peptonada 0,1%, de forma a obter a diluição 10^{-3} . Novamente homogeneizou-se o tubo da diluição 10^{-3} e transferiu-se assepticamente 1 mL para 9 mL no tubo de ensaio com água peptonada 0,1%, de forma a obter a diluição 10^{-4} .

Foram transferidos 1 mL das diluições selecionadas para o Petrifilm, levantando o filme superior e inoculando a diluição no centro da base do filme, posteriormente abaixou-se cuidadosamente o filme de cima para baixo espalhando o inóculo.

Foi distribuído o inóculo na área crescimento com baixa pressão com auxílio do espalhador de plástico, com o lado plano para baixo. Deixando em repouso a placa por no mínimo 1 minuto para permitir o gel solidificar.

2.2.2 Análise de coliformes totais e *E. coli*

A contagem de coliformes totais e *E. coli* (termotolerantes) foi realizada pela técnica de Petrifilm, método oficial da AOAC – *Association of Analytical Communities*, 998.08.

As placas para contagem de coliformes totais e *E. coli* foram incubadas em posição horizontal com o filme voltado para cima a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 horas. Foram selecionadas as placas de petrifilm que continham colônias vermelhas e azuis, com uma ou mais bolhas de gás associadas em um diâmetro não superior a uma colônia, sendo estas, contadas como coliformes. Colônias azuis que tinham uma ou mais bolhas de gás associadas em um diâmetro não superior a uma colônia, foram contadas como *E. coli*. Colônias vermelhas e azuis sem bolhas de gás não foram contados como coliformes.

2.2.3 Análise de bactérias mesófilas aeróbias

A contagem de bactérias mesófilas aeróbias foi realizada pela técnica de Petrifilm, método oficial da AOAC – *Association of Analytical Communities*, 990.12.

As placas foram incubadas em posição horizontal com o filme voltado para cima a

35 ± 1 °C durante 48 ± 3 horas. Foram contadas as placas imediatamente após o período de incubação.

2.2.4 *Bolores e leveduras*

A contagem de bolores e levedura foi realizada pela técnica de Petrifilm, método oficial da AOAC – *Association of Analytical Communities*, 997.02.

As placas foram incubadas em posição horizontal com o filme voltado para cima 20 a 25 °C durante 5 dias. Contou-se as placas imediatamente após o período de incubação. Foram selecionadas as placas de petrifilm que continham menos que 150 colônias azuis, verdes, azuis esverdeadas, esbranquiçado, ou que assumiram pigmentação natural (por exemplo, preto, amarelo, verde). Os bolores são em média dez vezes maiores e mais difusos do que as colônias de levedura. Não foram contadas as colônias que se sobrepueram a borda da área de crescimento.

Quando houve um elevado número de colônias de leveduras e bolores, onde os mesmos utilizaram toda a área de crescimento, não foram feitas contagens estimadas, mas sim, diluiu-se a suspensão teste para obter contagem mais precisa.

2.3 **Avaliação físico-química das barras de cereais**

Análises físico-químicas de determinação de umidade e de cinzas também foram realizadas, possibilitando a interpretação dos resultados microbiológicos. Às análises físico-químicas foram realizadas no período de fevereiro de 2017, no setor de físico-química do Laboratório de Análises de Alimentos da Universidade Comunitária da Região de Chapecó.

2.3.1 *Determinação de umidade*

A determinação de umidade foi realizada pelo método de dessecação direta em estufa a 105 °C, conforme procedimentos técnicos descrito pelas normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1985).

2.3.2 *Determinação de cinzas*

A determinação da matéria mineral (cinzas) foi realizada através da incineração das amostras de barra de cereais à temperatura de 500-550 °C em forno mufla, conforme método descrito pelas normas Analíticas do Instituto Adolf Lutz (IAL, 1985).

3 | **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

3.1 **Avaliação microbiológica**

A tabela 1 apresenta os resultados obtidos das análises de contagem de bactérias mesófilas aeróbias, coliformes totais, *Escherichia coli* e bolores e leveduras, realizadas nas

amostras de barra de cereais contendo castanha-do-brasil.

Barras	Mesófilos	Coliformes totais	<i>E. coli</i>	Bolores e leveduras
B1	1,3x10 ²	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹	1,0x10 ¹
B2	8,0x10 ¹	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹
B3	2,0x10 ¹	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹
B4	1,2x10 ²	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹
B5	5,0x10 ¹	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹	1,3x10 ¹
B6	1,4x10 ²	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹	1,0x10 ¹
B7	1,1x10 ²	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹	1,0x10 ¹
B8	9,0x10 ¹	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹

Tabela 1- Resultados da avaliação microbiológica em UFC/g das oito marcas de barras de cereais, Chapecó, 2017.

A tabela 2 apresenta os resultados obtidos das análises de contagem de bactérias mesófilas aeróbias, coliformes totais, *Escherichia coli* e bolores e leveduras, realizadas nas amostras castanha-do-brasil *in natura*.

Castanhas	Mesófilos	Coliformes totais	<i>E. coli</i>	Bolores e leveduras
C1	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹	1,0x10 ¹
C2	1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹
C3	1,0x10 ³	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹
C4	2,0x10 ¹	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹
C5	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹	2,0x10 ¹
C6	4,7x10 ³	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹	9,0x10 ¹
C7	4,6x10 ³	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹
C8	1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹

Tabela 2- Resultados da avaliação microbiológica em UFC/g das oito amostras de castanhas-do-brasil vendidas *in natura*, Chapecó, 2017.

Para contagem total de mesófilos aeróbios os resultados variaram na faixa de 2,0x10¹ UFC/g à 1,4x10² UFC/g para as barras de cereais, e de <1,0x10¹ a 4,7x10³ UFC/g para castanhas. Este parâmetro microbiológico é comumente utilizado como indicador de qualidade higiênica dos alimentos e, quando presente em grande número, indica falhas, ou falta de higiene durante a produção (CARDOSO et al., 2005).

Desta forma valores mais elevados para as castanhas comercializadas *in natura*, comparado às barras de cereais, são resultados aceitáveis, em virtude que, as barras de cereais passam por um processo de industrialização, e que, as amostras de castanhas não passam por nenhum tipo de tratamento e geralmente são descascadas manualmente, fator que eleva o risco de contaminação, devido ao contato direto do manipulador (RIBEIRO et al., 2016).

Desta forma os manipuladores de alimentos desempenham uma importante função

na preservação da higiene do alimento, uma vez que podem representar uma importante fonte de transmissão de patógenos (BLACK, 2002).

Para coliformes termotolerantes, todas as amostras atendem o estabelecido/regulamentado pela RDC Anvisa 12/2001, sendo que a contagem permitida é de 10 UFC/g para amostras de castanha e de $5,0 \times 10^0$ UFC/g para amostras de barra de cereais, ressalta-se que não foi encontrado colônias de coliformes termotolerantes nas amostras em estudo.

Para contagem total de bolores e leveduras os resultados variaram na faixa de $<1,0 \times 10^1$ UFC/g à $1,3 \times 10^2$ UFC/g para as barras de cereais, e de $<1,0 \times 10^1$ a $9,0 \times 10^1$ UFC/g para castanhas. Os valores mostram-se mais elevados nas barras, isto justifica-se, pois a alta concentração de carboidratos transforma as barras em “locais” estratégicos para o crescimento de fungos devido à criação de uma pressão osmótica elevada (BLACK, 2002).

Embora na legislação atual não esteja prevista a contagem total de fungos filamentosos e leveduras em amêndoas, os resultados foram indicativos de contaminação ambiental, fato este que serve de alerta, pois elevados níveis de contaminantes fúngicos representam riscos à saúde pública, tendo em vista que estes microrganismos estão diretamente associados a produção de micotoxinas, que dependendo de sua concentração, podem levar a transtornos digestivos e, por efeito cumulativo, a longo tempo desencadear processos carcinogênicos tanto no homem como animais (DINIZ et al., 2009).

Portanto, torna-se necessária a realização de controle de qualidade microbiológico em todo o processo de produção desse alimento, desde a análise dos ingredientes até o produto final. Pois, existem pesquisas que demonstram que os fungos podem contaminar cereais desde o plantio, como apresentado no estudo de Dilkin e colaboradores (2000), que identificaram a microbiota fúngica em híbridos de milho recém colhidos e no estudo de Concová e colaboradores (2006), que identificaram fungos e micotoxinas em trigo antes do armazenamento, demonstrando que a contaminação fúngica pode ocorrer em qualquer etapa da cadeia produtiva e desta forma, representar um importante fator desencadeador de risco à saúde dos consumidores.

3.2 Avaliação físico-química

Os valores obtidos através da avaliação físico-química de umidade e cinzas podem ser observados na tabela 3.

Barras de cereal	Peso total (g)	Umidade %	Cinzas %
B1	25	9,47	5,91
B2	20	1,98	8,08
B3	22	8,88	3,95
B4	22	8,79	4,02
B5	30	4,47	8,90
B6	20	12,47	6,08
B7	25	5,18	8,02
B8	27	5,30	5,34

Tabela 3 – Determinação da umidade e de cinzas das barras de cereais analisadas. Chapecó, 2017.

As barras de cereais diferiram entre si quanto aos valores de umidade, variando de 1,98% a 12,47% do valor total da barra. Ressalta-se que os teores de umidade estabelecido pela Resolução-RDC N° 263, de 22 de setembro de 2005, para produtos à base de cereais (BRASIL, 2005), devem ficar abaixo de 15%, resultados indicam que todas as amostras avaliadas atendem a legislação. Valores similares foram encontrados por Almeida e colaboradores (2014), tendo variação de umidade de 10,05 % a 12,65 %.

Valores próximos aos encontrados contribuem para armazenamento estável, sem alterações importantes na qualidade do produto (ESTÉVEZ, ESCOBAR e UGARTE, 2000), preservando a qualidade tecnológica das barras de cereais por favorecer a manutenção da crocância, atributo sensorial característico das barras de cereais (GUIMARÃES e SILVA, 2009). Além disso, os baixos teores de umidade podem evitar o escurecimento não enzimático, assim como proteger as barras de cereais do crescimento microbiano e, por conseguinte, aumentar a vida-de-prateleira do produto (CECCHI, 2003).

As barras de cereais apresentaram teores de cinzas que variaram de 3,95 % a 8,90 %. Segundo Cecchi (2003), o conteúdo de cinzas totais em cereais pode variar de 0,3 a 3,3 %, relacionando-se com o conteúdo de minerais no alimento. Portanto, as barras de cereais do presente estudo estão acima do recomendado para esse tipo de produto. Estudos semelhantes, como o de Bueno (2005), obtiveram resultados nas amostras que variaram de 1,18 a 1,21%. Guimarães e Silva (2009), encontraram valores de 1,15 a 1,38%.

Desta forma, considerando que o conteúdo de cinzas está relacionado ao teor de minerais do alimento, os valores elevados podem ser resultado da presença da castanha-do-brasil na sua composição, e também de outras oleoginosas, como a castanha-do-caju, a chia, linhaça, amêndoas, nozes, soja entre outras. Componentes estes, ricos em minerais, como potássio, fósforo, zinco, magnésio, manganês, ferro e selênio. Segundo Freitas e colaboradores (2002), em um estudo onde 40 castanhas foram analisadas individualmente, os valores de selênio variaram de 0,18 a 32,08 mg/100g, característica que demonstra a amplitude da concentração de minerais nas castanhas.

Segundo Silva, Ascheli e Souza (2010), é necessário ressaltar que o teor de minerais pode variar de acordo com o clima e, principalmente, com o tipo de solo, onde pode haver predominância de um ou outro mineral que a planta pode absorver em maior ou menor

quantidade.

Desta forma, essa variação na quantidade de minerais juntamente com a diversidade de oleginosas utilizadas como ingredientes para a produção das barras de cereais pode ser a explicação na variação dos resultados de cinzas.

4 | CONCLUSÕES

As barras de cereais e as amostras de castanha-do-brasil analisadas neste trabalho atenderam às determinações da RDC nº12/2001 para coliformes totais e termotolerantes. Entretanto, quatro marcas de barras de cereais e três amostras de castanha apresentaram-se contaminadas por bolores e leveduras, o que representa um risco adicional à saúde do consumidor. Isso mostra a importância de uma avaliação microbiológica incluir esses microrganismos apesar de não estarem presentes na legislação.

Para a avaliação físico química, a umidade se encontra dentro da legislação vigente e para cinzas, as barras apresentam valores elevados, provavelmente em virtude da composição das mesmas, onde estão presentes diversas oleginosas ricas em minerais. Em conjunto, portanto, esses resultados indicaram que as castanhas-do-brasil e barras de cereais contendo castanhas avaliadas na região de Chapecó-SC apresentam-se aptas para o consumo conforme a legislação vigente, porém indica-se a importância da análise de bolores e leveduras, que compreende um marcador importante a ser adicionado ao escopo de análises desse grupo de alimentos, para promover uma maior segurança alimentar e qualidade dos produtos.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, D.P.L.; PIRES, C.R.F.; COSTA, T.N.F.; SILVA, C.D.M. **Aproveitamento tecnológico da polpa de bacuri na obtenção de barras de cereais: um enfoque de agregação de valor aos frutos do cerrado**. p. 10, 2014. Disponível em: <http://www.eventos.uft.edu.br/index.php/sic/X/paper/viewFile/1498/424>. Acesso em: 18/04/2017.

BLACK, J. G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 12, de 02/01/2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Seção I, p. 45-53, 2001.

BRASIL. Resolução RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005-Aprova o regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, v. 142, n. 184, p. 368-369, 2005.

BUENO, R.O.G. **Características de qualidade de biscoitos e barras de cereais ricos em fibra alimentar a partir de farinha de semente e polpa de nêspera**. [dissertação]. Setor de Tecnologia: Universidade Federal do Paraná; 2005.

CARDOSO, R. C. V.; SOUZA, E. V. A.; SANTOS, P. Q. Unidades de alimentação e nutrição nos campi da Universidade Federal da Bahia: um estudo sob a perspectiva do alimento seguro. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 18, n. 5, p. 669-680, 2005.

CECCHI, H.M. **Fundamentos Teóricos e Práticos de Análise de Alimentos**. 2ª ed. Campinas: UNICAMP; 2003.

CONKOVÁ, E., LACIANKOVÁ, A., STIRIAK, I., CZERWIECKI, L., WILCZINSKA, G. Fungal contaminations and the levels of micotoxins (DON and OTA) in cereal sample from Poland and East Slovakia. **Czech J Food Sci.**; v. 24, p. 33-40, 2006.

DILKIN, P., MALLMANN, A.C., SANTUARIO, J.M., HICKMANN, J.L. Classificação macroscópica, identificação da microbiota fúngica e produção de aflatoxinas em híbridos de milho. **Ciência Rural**. v. 20. p.137, 2000.

DINIZ, S. P. S; OLIVEIRA, R. R.; ROMERO, A. **Fungos e micotoxinas** .In: KANZAKI, Luis Isamu Barros (Org). Desenvolvimento sustentável em áreas de extrativismo da castanha-do-brasil no sul do Amapá. Belém: Banco da Amazônia, p.146-179, 2009.

DUTRA-DE-OLIVEIRA, J. E.; SÉRGIO MARCHINI, J. **Ciências Nutricionais**. São Paulo: ed. Savier: 1998.

ESTÉVEZ, A. M.; ESCOBAR, B. A.; UGARTE, V. A. Utilización de cotilédones de algarobo [*Prosopis chilensis* (Moe) Stuntz] en la elaboración de barra de cereales. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.50, n.2, p.148-154, 2000.

ENRÍQUEZ, G.; SILVA, M. A.; CABRAL, E. **Biodiversidade da Amazônia**: usos e potencialidades dos mais importantes produtos naturais do Pará. Belém. NUMA/UFGPA, 2003.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, p. 182, 2005.

FREITAS, S.C. de; SANTOS, N.M.S. dos; ANTONIASSI, R. Selênio em castanhas do Brasil (*Bertholletia excelsa*) In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, Porto Alegre, RS. **Anais...** Porto Alegre: SBCTA, p.18, 2002.

GUIMARÃES, M. M.; SILVA, M. S. Qualidade nutricional e aceitabilidade de barras de cereais adicionadas de frutos de murici-passa. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.68, n.3, p.426-433, 2009.

GLÓRIA, M. M.; REGITANO-d'ARCE, M. A. B. Concentrado e isolado proteico de torta de castanha-do-Pará: Obtenção e caracterização química e funcional. **Ciências Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v.20, n. 2, p.240-245, 2000.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 3.ed., São Paulo, Inst. Adolfo Lutz, v.1, p.21-28, 1985.

KANNAMKUMARATH, S. S.; WROBEL, K.; WUILLOUD, R. G. Studying the distribution pattern of selenium in nut proteins with information obtained from SEC- UV-ICP-MS and CE -ICP-MS. **Talanta**, v. 66, n. 1, p. 153-159, 2004.

LORENZI, H. **Brazilian Trees: A Guide to the Identification and Cultivation of Brazilian Native Trees**, Nova Odessa, Plantarum, p. 368, 2000.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 10. ed., São Paulo: Roca, p.1157, 2002.

PARIZ, KELIMAR LEVIS. **Avaliação da qualidade microbiológica de polpas de frutas. Bento Gonçalves**. p.47, 2011. Disponível em: [http://www.bento.ifrs.edu.br/site/midias/arquivos/2012424102432265tcc\[15\]_completo_kelimar_levis_de_pariz.pdf](http://www.bento.ifrs.edu.br/site/midias/arquivos/2012424102432265tcc[15]_completo_kelimar_levis_de_pariz.pdf). Acesso em: 21 de mai.de 2016.

RIBEIRO, M. S. S.; LEHALLE, A. L. C.; COLAÇO, R. M. N.; SOUSA, C. L.; ABREU, L. F. Avaliação microbiológica de castanhas-do-brasil comercializadas na cidade de Belém-PA. CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 25., 2016, Gramado. **Anais...** Gramado: SBCTA Regional, 2016. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/151368/1/2016-Microbiologia-Castanha.pdf>. Acesso em: 20 de maio de 2017.

RODRIGUES, P.M. **Microbiologia dos Processos Alimentares**. São Paulo: Varela, p. 258, 2005.

SILVA, N. et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3^a edição. São Paulo: Livraria Varela, 2007.

SILVA, R.F., ASCHELI, J.L.R., SOUZA, J.M.L. Influência do processo de beneficiamento na qualidade de amêndoas de castanha-do-brasil. **Ciênc agrotec**. v. 34, n. 2, p. 445-450, 2010.

SOUZA, M. L., MENEZES, H. C. Processamentos de amêndoa e torta de castanha-do-brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. **Ciênc. Technol. Aliment.** [online]. vol.24, n.1, pp.120-128, 2004.

TEODORO, D. M. D. **Avaliação dos teores de Mercúrio e Selênio em pescados da Região Amazônica**. 2006. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal do Pará (UFPA). Belém, Pará, 2006.

CAPÍTULO 8

APLICACIÓN DE PCR Y MALDITOF EN LA IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS DEL GÉNERO *CANDIDA*

Data de aceite: 01/11/2021

Data de submissão: 15/10/2021

Alejandra Paula Espinosa Taxis

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla,
Puebla. Centro de Investigaciones en Ciencias
Microbiológicas. Puebla, Puebla
<https://orcid.org/0000-0002-6402-7902>

Débora Vázquez Domínguez

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla,
Puebla. Centro de Investigaciones en Ciencias
Microbiológicas. Puebla, Puebla
<https://orcid.org/0000-0002-5466-9792>

David Iván Loaiza Toscuento

Instituto Nacional de Astrofísica y Óptica
Electrónica. Coordinación de Óptica. Puebla,
Puebla
<https://orcid.org/0000-0003-1669-4900>

Eulogio Valentín Gómez

Universidad de Valencia. Departamento
de Microbiología y Ecología, Facultad de
Farmacia. Valencia, España
<https://orcid.org/0000-0002-7895-9460>

Teresita Spezzia Mazzocco

Instituto Nacional de Astrofísica y Óptica
Electrónica. Coordinación de Óptica. Puebla,
Puebla
<https://orcid.org/0000-0002-1203-2697>

RESUMEN: En los últimos años el padecimiento por hongos oportunistas incrementó notablemente, siendo la candidiasis la micosis

más frecuente. La candidiasis es una micosis oportunista ocasionada por levaduras del género *Candida*. Esta micosis es generalmente de origen endógeno, y puede localizarse a nivel superficial, en tejido celular subcutáneo y, en casos extremos, en órganos y tejidos. Hasta hace algunos años *C. albicans* era la especie reportada con mayor frecuencia, pero su incidencia ha ido disminuyendo a expensas del aumento de especies no *albicans*, como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. auris* entre otras, las cuales pueden conducir desde una infección cutánea sin sintomatología hasta una infección sistémica con consecuencias fatales en el paciente, pudiendo constituir un importante problema de salud intrahospitalario. Por lo tanto, la identificación rápida y precisa de las levaduras del género *Candida*, es importante para la aplicación del tratamiento efectivo en estadios tempranos de la enfermedad, la disminución de cepas resistentes, incrementando las posibilidades de supervivencia del paciente. Su identificación se basa en pruebas atendiendo criterios fenotípicos y genotípicos como la PCR especie-específico y espectrometría de masas (MALDITOF), que son útiles, disminuyen el tiempo de identificación y aumentan la sensibilidad y especificidad para identificar microorganismos a nivel de especie. En este capítulo trataremos el uso de PCR y MALDITOF para la identificación de las especies del género *Candida* y los resultados obtenidos en nuestro grupo con X cepas de *Candida*.

PALABRAS CLAVE: Candidiasis, *Candida* spp., PCR, MALDITOF.

APPLICATION OF PCR AND MALDITOF IN THE IDENTIFICATION OF YEAST OF THE GENUS CANDIDA

ABSTRACT: In recent years, the disease caused by opportunistic fungi has increased notably, with candidiasis being the most frequent mycosis. Candidiasis is an opportunistic fungal infection caused by yeasts of the genus *Candida*. This mycosis is generally of endogenous origin, and can be located superficially, in subcutaneous cellular tissue and, in extreme cases, in organs and tissues. Until a few years ago *C. albicans* was the most frequently reported species, but its incidence has been decreasing at the expense of the increase of non-albicans species, such as *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. auris* among others, which can lead from a skin infection without symptoms to a systemic infection with fatal consequences for the patient, and may constitute an important inpatient health problem. Therefore, the rapid and accurate identification of yeasts of the genus *Candida* is important for the application of effective treatment in early stages of the disease, the reduction of resistant strains, increasing the chances of survival of the patient. Its identification is based on tests attending phenotypic and genotypic criteria such as species-specific PCR and mass spectrometry (MALDITOF), which are useful, decreasing the identification time and increasing the sensitivity and specificity to identify microorganisms at the species level. In this chapter we will discuss the use of PCR and MALDITOF for the identification of species of the genus *Candida* and the results obtained in our group with 35 clinical strains of *Candida*.

KEYWORDS: Candidiasis, *Candida* spp., PCR, MALDITOF.

1 | INTRODUCCIÓN

El género *Candida* abarca una variedad de más de 400 levaduras asexuales. En individuos sanos las especies de *Candida* son consideradas como levaduras comensales, de hecho, solo un número limitado de *Candidas* se comportan como patógenos oportunistas, las conocidas hasta el 2014 son: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae*, *Candida dubliniensis*, *Candida pelliculosa*, *Candida kefyr*, *Candida lipolytica*, *Candida famata*, *Candida inconspicua*, *Candida rugosagensis*(Yapar). Y más recientemente *Candida auris*, que es posiblemente la especie más peligrosa de *Candida* conocida, dada su resistencia a múltiples fármacos y su alta mortalidad.

Las infecciones por *Candida* son la principal causa de infecciones micóticas en el mundo, además, se han convertido en la cuarta causa más común de infecciones sistémicas nosocomiales, asociadas con una tasa bruta de mortalidad del 39%(Sandhu et al.) La especie de *C. albicans* es la más conocida y vinculada a infecciones micóticas en humanos desde antaño, sin embargo, en las últimas décadas se han incrementado considerablemente los casos de infecciones por *Candida* no *albicans*, en especial por *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei* tanto en infecciones fúngicas locales como en infecciones sistémicas(Kołaczkowska and Kołaczkowski; Kim et al.; Yapar). Por otro lado, se dispone de un número limitado

de agentes antifúngicos de unas pocas clases de fármacos para tratar a pacientes con estas infecciones. Esto se agrava con el hecho de que las *Candida* no *albicans* son más propensas a desarrollar resistencia antifúngica. Se han producido informes cada vez mayores de resistencia a múltiples fármacos a los azoles, las equinocandinas y los polienos en varias especies de *Candida* (Arendrup and Patterson), por lo que, para poder ofrecer un tratamiento adecuado es necesario identificar correctamente la cepa patógena y conocer la resistencia farmacológica que pueda presentar. Por lo tanto, la identificación del patógeno se convierte en una necesidad para la sobrevivencia de pacientes hospitalizados y para los controles epidemiológicos. Especialmente con la reciente aparición de *C. auris*, la cual es comúnmente identificada de forma errónea como varias especies de levadura diferentes por plataformas de identificación fenotípica disponibles comercialmente (Posteraro and Sanguinetti).

También es importante tener en cuenta que, dada la situación sanitaria internacional actual, los pacientes con COVID-19 tienen más probabilidad de desarrollar coinfecciones fúngicas con consecuencias mortales, algunas investigaciones han demostrado coinfección con *C. albicans* y *C. glabrata* en pacientes críticamente enfermos por COVID-19 (Yang et al.; Chen et al.), con el riesgo que esto representa. Con base en la experiencia del SARS en 2003 y los casos de aspergilosis invasiva combinados con influenza grave (Song et al.; Gangneux et al.), es de vital importancia prestar atención a la identificación oportuna de *Candida* en personas infectadas por COVID-19.

Actualmente, existe una variedad de técnicas para identificar levaduras a partir de muestras clínicas. Estas pueden incluir desde métodos tradicionales, como los criterios morfológicos, en donde la prueba del tubo germinativo es el estándar de laboratorio para identificar *C. albicans*, o la presencia de clamidosporas en *C. albicans* y *C. dubliniensis* (Byadarahally Raju and Rajappa). Entre otros están los métodos comerciales de identificación enzimática, y las técnicas de tipificación molecular desarrolladas más recientemente (Kim et al.). Neppelenbroek y colaboradores clasifican las técnicas de identificación para *Candida* de la siguiente manera (Neppelenbroek et al.):

I. Métodos fenotípicos:

- Métodos no disponibles comercialmente: prueba de tubo germinativo, formación de clamidosporas y temperatura de crecimiento, asimilación de carbono y nitrógeno, fermentación de carbohidratos.
- Sistemas comerciales de identificación rápida: API 20C Aux, ID 32, API Candida, API Yeast, Microring YT.
- Sistemas comerciales basados en medios cromogénicos: CHROMagar Candida, Método de filtración por membrana fluorogénica, Candida ID, Auxacolor, Panel de identificación de levadura Baxter MicroScan, Uni-Yeast Tek, RapID Yeast Plus, Fungichrom I, BiGGY Agar.

II. Enfoques especializados basados en instrumentos: Vitek YBC, Vitek 2 ID-YST, Abbott Quantum II, Microbial Identification.

III. Biotipado: Prueba de opacidad Tween 80

IV. Métodos de identificación molecular

- Métodos basados en PCR-based methods: PCR-multiple, PCR anidado, PCR en tiempo real.
- Métodos moleculares no basados en PCR: Protocolo de hibridación *in situ* de fluorescencia de ácido nucleico peptídico, pirolisis, ionización MALDI (desorción/ionización mediante láser asistida por matriz), acoplada a un analizador TOF (tiempo de vuelo).

Los métodos de identificación de rutina como microscopía, sistema automatizado de hemocultivo y pruebas bioquímicas para identificar *Candida* spp. pueden consumir mucho tiempo debido al tiempo de generación de la levadura, al igual que las pruebas de susceptibilidad antifúngica, las cuales, además, pueden dar resultados variables dependiendo del experimentador, ya que hay una característica subjetiva, por ejemplo, en la medición del CMI (concentración mínima inhibitoria). Los análisis *in vitro* mediante diferentes pruebas de laboratorio de susceptibilidad antifúngica están garantizadas por protocolos estandarizados e implementado por el Clinical and Laboratory Standard Institute (USA, CLSI) y el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (Posteraro and Sanguinetti; Delavy et al.). Sin embargo, estos métodos pueden presentar inconvenientes dada la constante aparición de cepas multiresistentes. O en el caso de varios de los sistemas de identificación comercial como Vitek-2, BD Phoenix, API-20, y MicroScan, no son capaces de identificar con exactitud a *C. famata*, *Candida meyerozyma*, *C. guilliermondii*, o *C. auris* (Mizusawa et al.; Kim et al.) por lo que la búsqueda de métodos alternativos más eficientes es requerida, así los métodos de identificación molecular han incrementado su auge. Dentro de las técnicas de identificación más confiables se encuentran las pruebas de espectrometría de masas MALDI-TOF y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

2 | MALDI-TOF

La técnica de MALDI-TOF ha revolucionado el campo de la microbiología al aportar una herramienta que ayuda a la identificación de especies de una manera precisa y rápida, además de agilizar la determinación de la resistencia a los antimicrobianos. Se inició su uso a finales de la década de los 90s para la identificación de bacterias (Arnold and Reilly) y que posteriormente se ha difundido en otros microorganismos como levaduras y hongos (Marklein et al.; Posteraro et al.). La ionización MALDI (desorción/ionización mediante láser asistida por matriz), acoplada a un analizador TOF (tiempo de vuelo) consiste en hacer incidir un rayo láser sobre un microorganismo embebido en una matriz, que provoca la ionización de

una serie de proteínas y tras ser sometidos a un campo electrónico estas migran por un tubo con vacío hasta un detector donde se calcula la masa de cada proteína, por el tiempo de vuelo. El sistema lee una serie de espectros que son comparados con una base de datos que contiene el espectro esperado de cada microorganismo analizado, permitiendo así, la identificación de cepas clínicas entre género y especie. Los sistemas comerciales más empleados en la actualidad que usan la tecnología MALDI-TOF para identificación de microorganismos son el sistema VITEK®MS (bioMérieux, Durham, NC) y el sistema MALDI Biotyper® (Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA). Las bases de datos de los espectros de referencia se comercializan como parte de un sistema patentado y son construidas y mantenidas por los fabricantes. En la identificación, estos sistemas asignan un valor de puntuación (MALDI Biotyper®) o nivel de confianza (VITEK®MS) a cada coincidencia, con base en las similitudes del microorganismo con los espectros de referencia, obteniendo una identificación con un nivel de confianza que se calcula con base al porcentaje de probabilidad y el número de opciones de microorganismos posibles (Maldonado et al.).

MALDI-TOF MS puede detectar entre 95.7–100% de las especies comunes de *Candida*, tales como; *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, y *C. tropicalis* (Bader et al.; Bille et al.; Iriart et al.). La precisión es menor para otras especies menos comunes como *C. inconspicua*, *C. rugosa* y *C. norvegensis* (73,6 a 88,9%), aun así, el resultado es superior al obtenido con los métodos clásicos y se espera que mejore al actualizar las bases de datos (Delavy et al.). El método de MALDI-TOF MS constituye, además, una alternativa prometedora para estudiar la resistencia antifúngica en poco tiempo, especialmente útil para microorganismos multiresistentes ya que el método MALDI-TOF tiene la capacidad de identificar la susceptibilidad de muchas bacterias y varios hongos a diversos antimicrobianos en un promedio de 6 a 15 h. Una cepa susceptible crecerá menos y por lo tanto mostrará picos de intensidad más bajos, mientras que las cepas resistentes mostrarán intensidades de picos más altas, debidos a un mayor crecimiento (Oviaño et al.). Como se puede observar en la **Tabla 1**, ya hay reportes que confirman la identificación satisfactoria de levaduras del género *Candida* empleando los métodos de MALDI-TOF.

REFERENCIA	ESPECIE IDENTIFICADA	SITIO DE AISLAMIENTO	MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN	RESISTENCIA
(Bellanger et al.)	<i>C. lusitaniae</i> , <i>C. kefyr</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. dubliniensis</i>	Materiales clínicos (abscesos, hematomas, huesos, fungemia, fluidos corporales, etc.).	MALDI-TOF MS	-
(Kwon et al.)	<i>C. auris</i>	Sangre (4), orejas (57)	MALDI-TOF MS	Fluconazol 62.3%
(Colabella et al.)	256 cepas de: <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. glabrata</i> y <i>C. tropicalis</i> ,	Sangre	Secuenciación de nueva generación (NGS) y espectroscopia FTIR	-
(Kim et al.)	<i>C. famata</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. auris</i> , <i>C. lusitaniae</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>M. guilliermondii</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. haemulonii</i>	Materiales clínicos: (sangre, orina, flujo vaginal, oreja, pus, etc	MALDI-TOF MS (Vitek MS Bruker Biotyper) / DNA Sequencing/ Phoenix ID	-
(Vatanshenassan et al.)	<i>C. auris</i>	Cultivos de colección y aislamientos de materiales clínicos	MALDI-TOF MS	Echinocandinas
(Bal and McGill)	<i>C. tropicalis</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>C. kefyr</i> , <i>C. lusitaniae</i>	Sangre	Sepsityper-MALDI-TOF	Fluconazol, Echinocandinas
(Maldonado et al.)	<i>C. parapsilosis</i> (28), <i>C. glabrata</i> (34), <i>C. krusei</i> (24), <i>C. tropicalis</i> (45), <i>C. guilliermondii</i> (30), <i>C. albicans</i> (28), <i>C. dubliniensis</i> (6), <i>C. kefyr</i> (1) y <i>C. lipolytica</i>	Materiales clínicos	MALDI-TOF MS	-

Tabla 1. Referencias de trabajos de identificación de cepas del género *Candida* empleando métodos de MALDITOF

2.1 Metodología de la técnica de MALDI – TOF

El programa MALDITOF VITEK MS IVD es comúnmente utilizado para la identificación de cepas de importancia médica. Las muestras se pueden obtener a partir de un cultivo puro como YPD para ser colocadas sobre una placa metálica conductora que contiene un espacio para 16 muestras, luego se adiciona una gota de ácido fórmico para romper la pared celular, posteriormente se le adiciona una matriz orgánica diseñada por el fabricante para lograr una co-cristalización muestra - matriz, que ayuda a identificar las proteínas. Para cada placa se coloca una muestra control. Las placas se reciben en el equipo y se procesan, los resultados se obtienen en menos de una hora según el número de muestras, y mediante la comparación de espectros en una base de datos se permite la discriminación y confirmación a nivel de género y especie.

En el laboratorio de Micología Médica de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla en colaboración con el Dr. Eulogio Valentín Gómez de la Universidad de Valencia se

realizó un ensayo utilizando el programa MALDITOF VITEK MS IVD donde se identificaron 35 cepas clínicas. Adicionales al ensayo de identificación se usaron 3 cepas tipo para *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*. Se identificaron 9 cepas clínicas para *C. tropicalis*, 6 para *C. albicans*, 7 para *C. glabrata*, 11 *C. guilliermondii*, 1 *C. parapsilosis* y 1 cepa clínica 50 / 50 % de probabilidad entre *C. glabrata* y *C. guilliermondii*. Todas las cepas control fueron identificadas correctamente mostrando que a través de esta técnica se pueden obtener resultados correctos de identificación de cepas clínicas(Vázquez Dominguez).

3 I REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR es una técnica que permite amplificar pequeñas regiones específicas de un segmento de ADN, generando millones de copias mediante el uso de oligonucleótidos específicos, obteniendo resultados de la identificación del microorganismo en pocas horas, por lo que es una técnica rápida y eficiente.

La PCR permite la amplificación *in vitro* de una secuencia específica del ADN, se basa en el uso de dos oligonucleótidos que, al reconocer la secuencia complementaria en el ADN, son alargados cíclicamente mediado por la acción de la ADN polimerasa, de la ADN polimerasa termoestable Taq (Taq polimerasa), que es capaz de soportar variaciones de temperaturas.

El estándar de oro internacional para la identificación de especies fúngicas es la amplificación y secuenciación del espaciador transcrito interno (ITS) del ADNr, a partir de las regiones ITS1 (espaciador intergénico) e ITS2 (espaciador intergénico 2), técnica descrita en el trabajo de Luo y Mitchel en el 2002 (**Tabla 2**).

ESPECIE	NOMBRE	SECUENCIA	GEN	PARES DE BASES
<i>C. albicans</i>	CALB1 F CALB1 R	TTC ATC AAC TTG TCA CAC CAG A/ ATC CCG CCT TAC CAC TAC CG	ITS1 e ITS2 del ARNr	273
<i>C. tropicalis</i>	CTR1 CTR2	CAA TCC TAC CGC CAG AGG TTA T/ TGG CCA CTA GCA AAA TAA GCG T	ITS1 e ITS2 del ARNr	357
<i>C. glabrata</i>	CGL1 CGL2	TTA TCA CAC GAC TCG ACA CT/ CCC ACA TAC TGA TAT GGC CTA CAA	ITS1 e ITS2 del ARNr	423

Tabla 2. Oligonucleótidos específicos empleados para la identificación molecular de las especies de *Candida*(Luo and Mitchell).

Los genes ribosomales que codifican las subunidades 5.8S, 18S y 26S, espaciadores transcritos internos (ITS) y las regiones externas (ETS) están dispuestos en tándem formando unidades de transcripción que se repiten en el genoma de las levaduras (**Figura 1**) y particularmente se utilizan para la identificación del género *Candida*.

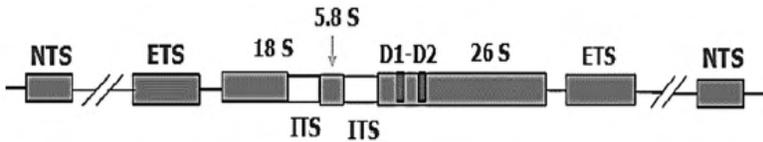


Figura 1. Representación esquemática de las subunidades ARNr. Esquema tomado de Vásquez, C. J. A., *et al.* 2016(Vásquez C et al.).

Luo y Mitchel(Luo and Mitchell) diseñaron un método de PCR múltiplex para identificar simultáneamente múltiples patógenos fúngicos como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *Aspergillus fumigatus* en una sola reacción utilizando ADN genómico extraído y la suspensión de levaduras tomado directamente de un cultivo puro.

Tres cebadores específicos de especies en un solo tubo de PCR: CGL1-CGL2, CTR1-CTR2 y CPA1-CPA2 combinados en una PCR múltiplex para identificar *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*, respectivamente (multiplex GTP); por otra parte, combinaron los cebadores AFUM1-AFUM2, CALB1-CALB2 y CN5-CN4 en otra PCR múltiplex para identificar *A. fumigatus*, *C. albicans* y *C. neoformans*, respectivamente (FAN multiplex). Este método de PCR múltiple proporciona una alternativa rápida, simple y confiable a los métodos convencionales para identificar aislados de hongos clínicos comunes con una sensibilidad y especificidad del 100% (Luo and Mitchell; Camacho-Cardoso et al.).

Otra herramienta empleada en la identificación de estas especies es la amplificación de genes *GPI* que codifican para glicosilfosfatidilinositol, amplificación de genes del intrón *RPS0* que es un componente de la maquinaria de traducción y está extremadamente conservada entre las especies de levaduras. García Martínez, J. M. *et al.* Realizaron un ensayo de PCR basado en el uso de cebadores dirigidos al gen *RPS0* de ocho especies de levaduras (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. zeylanoides*, *Debariomyces hansenii* y *P. guilliermondii*) para obtener un fragmento de ADN específico para cada especie. Todos los cebadores corresponden a la región del intrón excepto los de *Pichia guilliermondii* que se definen a partir de las áreas del exón, los cuales permiten la correcta identificación de especies, que han sido mal identificadas por métodos convencionales, como *D. hansenii* y *C. albicans*, que a menudo se identifican como *C. parapsilosis* y *C. dubliniensis*, respectivamente. En el estudio se obtuvo una fuerte especificidad (100%) y el tamaño de amplicones esperado.

Existen cepas que fenotípicamente son similares y muchas veces se han identificado erróneamente, tal es el caso de las cepas *C. auris* que fenotípicamente son similares a *C. haemulonii* pero también suele confundirse con cepas *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. sake*, *Rhodotorula glutinis* y *Saccharomyces cerevisiae*. Kordalewska M., *et al.*, realizaron un estudio implementando la PCR convencional y en tiempo real diseñando amplicones tal que cubrían un fragmento de ARNr 5.8S, todo

ITS2 y un fragmento de ARNr 28S. Los cebadores CauF y CauR se diseñaron para amplificar selectivamente un producto de PCR de 163 pb de longitud específico para *C. auris* únicamente. Los cebadores CauReIF y CauReIR se diseñaron para amplificar selectivamente productos de PCR de *C. auris*, *C. duobushaemulonii*, *C. haemulonii* o *C. lusitaniae*. Los fragmentos amplificados difieren en longitud (215 pb, 208 pb, 197 pb y 203 pb, respectivamente) y composición. En el ensayo no se detectaron productos de PCR para otros aislados de levadura y moho o ADN humano. La precisión del ensayo fue confirmada probando un panel de 46 aislamientos entre ellos además *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. famata*, *C. sake*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus fumigatus*, entre otros. Finalmente, en todos los ensayos se presentó una precisión del 100% de los aislados *C. auris*, *C. duobushaemulonii*, *C. haemulonii* y *C. lusitaniae* lo que permite una discriminación inequívoca (Kordalewska et al.). Por otro lado, Ruiz Gaitán y colaboradores (Ruiz-Gaitán et al.) realizaron un método alternativo para la identificación correcta de cepas de *C. auris* por PCR de colonia y ADN genómico mediante el diseño de cebadores de genes únicos que codifican la proteína GPI, la especificidad de los cebadores utilizados para *C. auris* que se verificaron con un panel de 19 *Candida* de diferentes especies, que comprendían cepas *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*, *C. boidinii*, *C. duobushaemulonii*, *C. inconspicua*, *C. intermedia*, *C. metapsilosis*, *C. nivariensis*, *C. pseudohaemulonii*, *C. rugosa*, *C. zeylanoides* y especies más estrechamente relacionadas como, *C. lusitaniae* y *C. haemulonii*. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 2%. Esta técnica de PCR basada en la singularidad de genes que codifican la proteína GPI se mostró útil para la identificación fácil, económica y precisa para la identificación de infecciones por *C. auris* en un entorno clínico.

A continuación, se describe la metodología de la técnica de PCR empleada en las cepas antes mencionadas (Vázquez Domínguez).

PCR de colonia. Se puede realizar la PCR directamente de las colonias aisladas, una vez cultivadas las levaduras a estudiar en medio YPD por 24 horas a 37°C, se toma una sola colonia, se agregan 3 µl de una solución de Hidróxido de sodio 0.02 M (NaOH), a 95°C por 10 minutos. Cada reacción de PCR se prepara con 12.5 µl de DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific), 2.5 µl de cada primer a una concentración de 1 µM y 2 µl de ADN previamente extraído, aforando a 25 µl con agua. En cada ensayo se incluye un control negativo que contiene únicamente agua en lugar de ADN. La PCR se realiza en un termociclador (Eppendorf), programando una fase inicial de desnaturalización a 96°C por 5 minutos, seguida por 40 ciclos, iniciando con una temperatura de 94°C por 30 segundos, posteriormente la fase de alineación a 58°C por 30 segundos y la fase de elongación a 72°C por 30 segundos. Finalmente, la fase de elongación final a 72°C durante 10 minutos.

Obtenidos los amplificadores de PCR, se realiza un análisis electroforético en un gel de agarosa al 1.5%; colocando en cada pozo del gel 5 µl del producto de PCR, y un pozo

para depositar 6 µl del marcador de peso molecular 1 kb (Thermo scientific) diluido como lo marca el inserto del producto. A la cámara electroforética donde está colocado el gel con las muestras se le aplica un voltaje de 90 V. Posteriormente el gel de agarosa se tiñe con bromuro de etidio 1 µg/ml y se visualiza en un transiluminador (luz ultra violeta) (Benchtop 2UV™). Los productos de PCR se comparan con el tamaño del marcador de peso molecular (**Figura 2**).

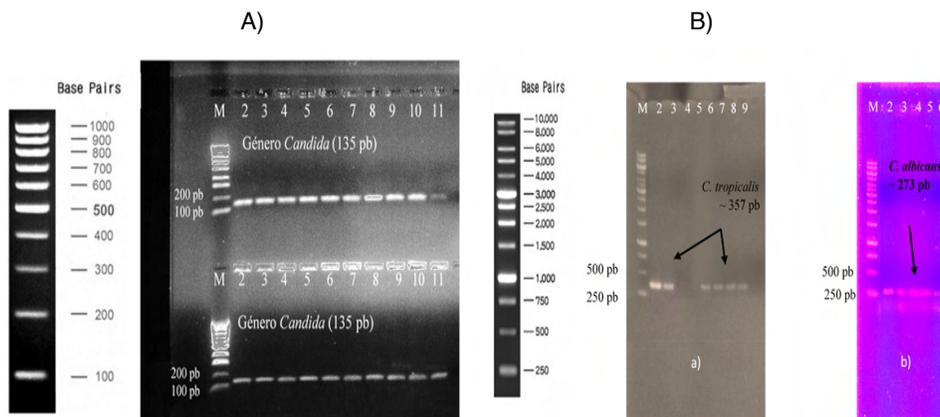


Figura 2. A) Electroforesis en gel de agarosa 2 % con amplificación de genes para proteínas 5.8S rRNA, pocillos 2 - 11 superior e inferior género *Candida*; los controles utilizados fueron CAF2, MYA3404 y ATCC 2001; para *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* respectivamente. (M) Marcador de peso molecular. B) Electroforesis en gel de agarosa 1.5 % con amplificación de las regiones ITS1 e ITS2 ≈ 357 pb para a) *C. tropicalis* (en 2,3,5-8 pocillos) y ≈ 273 pb para b) *C. albicans* (en 2 - 6 pocillos). Los controles utilizados MYA3404 y CAF2 respectivamente. (M) Marcador de peso molecular.

4 | CONCLUSIÓN

Por lo anteriormente expuesto podemos concluir que la PCR, puede considerarse como el estándar de oro para la identificación de especies del género *Candida*, por ser una herramienta de laboratorio rápida y precisa, de gran sensibilidad y especificidad; que aunada al empleo del MALDITOF garantiza la identificación de éstas levaduras.

REFERENCIAS

Arendrup, Maiken Cavling, and Thomas F. Patterson. "Multidrug-Resistant Candida: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment." *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 216, no. suppl_3, Aug. 2017, pp. S445–51, doi:10.1093/infdis/jix131.

Arnold, Randy J., and James P. Reilly. "Fingerprint Matching Of E. Coli Strains with Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry of Whole Cells Using a Modified Correlation Approach." *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 12, no. 10, May 1998, pp. 630–36, doi:10.1002/(SICI)1097-0231(19980529)12:10<630::AID-RCM206>3.0.CO;2-0.

Bader, O., et al. *Improved Clinical Laboratory Identification of Human Pathogenic Yeasts by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*. 2010.

Bal, AM, and M. McGill. "Rapid Species Identification of Candida Directly from Blood Culture Broths by Sepsityper-MALDI-TOF Mass Spectrometry: Impact on Antifungal Therapy." *Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*, vol. 48, no. 2, 2018, pp. 114–19, doi:10.4997/JRCPE.2018.203.

Bellanger, Anne-Pauline, et al. "Rapid Identification of Candida Sp. by MALDI - TOF Mass Spectrometry Subsequent to Short-term Incubation on a Solid Medium." *APMIS*, vol. 127, no. 4, Apr. 2019, pp. 217–21, doi:10.1111/apm.12936.

Bille, E., et al. "MALDI-TOF MS Andromas Strategy for the Routine Identification of Bacteria, Mycobacteria, Yeasts, Aspergillus Spp. and Positive Blood Cultures." *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 18, no. 11, Nov. 2012, pp. 1117–25, doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03688.x.

Byadarahally Raju, Smitha, and Shashanka Rajappa. "Isolation and Identification of Candida from the Oral Cavity." *ISRN Dentistry*, vol. 2011, Oct. 2011, pp. 1–7, doi:10.5402/2011/487921.

Camacho-Cardoso, José Luis, et al. "Detección Molecular de Especies de Candida En Especímenes de Pacientes Hospitalizados." *Gaceta Medica de Mexico*, vol. 153, no. 5, 2017, pp. 581–89, doi:10.24875/GMM.17002535.

Chen, Nanshan, et al. "Epidemiological and Clinical Characteristics of 99 Cases of 2019 Novel Coronavirus Pneumonia in Wuhan, China: A Descriptive Study." *The Lancet*, vol. 395, no. 10223, Feb. 2020, pp. 507–13, doi:10.1016/S0140-6736(20)30211-7.

Colabella, Claudia, et al. "Merging FT-IR and NGS for Simultaneous Phenotypic and Genotypic Identification of Pathogenic Candida Species." *PLOS ONE*, edited by Alix Therese Coste, vol. 12, no. 12, Dec. 2017, p. e0188104, doi:10.1371/journal.pone.0188104.

Delavy, Margot, et al. "Investigating Antifungal Susceptibility in Candida Species With MALDI-TOF MS-Based Assays." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 9, Feb. 2019, doi:10.3389/fcimb.2019.00019.

Gangneux, J. P., et al. "Invasive Fungal Diseases during COVID-19: We Should Be Prepared." *Journal de Mycologie Médicale*, vol. 30, no. 2, June 2020, p. 100971, doi:10.1016/j.mycmed.2020.100971.

Iriart, Xavier, et al. "Routine Identification of Medical Fungi by the New Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight System with a New Time-Effective Strategy." *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 50, no. 6, June 2012, pp. 2107–10, doi:10.1128/JCM.06713-11.

Kim, Tae-Hyoung, et al. "Identification of Uncommon Candida Species Using Commercial Identification Systems." *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 26, no. 12, Dec. 2016, pp. 2206–13, doi:10.4014/jmb.1609.09012.

Kończakowska, Anna, and Marcin Kończakowski. "Drug Resistance Mechanisms and Their Regulation in Non- Albicans Candida Species." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 71, no. 6, June 2016, pp. 1438–50, doi:10.1093/jac/dkv445.

Kordalewska, Milena, et al. "Rapid and Accurate Molecular Identification of the Emerging Multidrug-Resistant Pathogen Candida Auris." *Journal of Clinical Microbiology*, edited by Daniel J. Diekema, vol. 55, no. 8, Aug. 2017, pp. 2445–52, doi:10.1128/JCM.00630-17.

Kwon, Yong Jun, et al. "Candida Auris Clinical Isolates from South Korea: Identification, Antifungal Susceptibility, and Genotyping." *Journal of Clinical Microbiology*, edited by Geoffrey A. Land, vol. 57, no. 4, Apr. 2019, doi:10.1128/JCM.01624-18.

- Luo, Guizhen, and Thomas G. Mitchell. "Rapid Identification of Pathogenic Fungi Directly from Cultures by Using Multiplex PCR." *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 40, no. 8, Aug. 2002, pp. 2860–65, doi:10.1128/JCM.40.8.2860-2865.2002.
- Maldonado, Ivana, et al. "Identificación de Levaduras Del Género Candida: Los Métodos Convencionales Frente a MALDI-TOF MS." *Revista Iberoamericana de Micología*, vol. 35, no. 3, July 2018, pp. 151–54, doi:10.1016/j.riam.2018.02.002.
- Marklein, G., et al. "Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Fast and Reliable Identification of Clinical Yeast Isolates." *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 47, no. 9, Sept. 2009, pp. 2912–17, doi:10.1128/JCM.00389-09.
- Mizusawa, Masako, et al. "Can Multidrug-Resistant *Candida auris* Be Reliably Identified in Clinical Microbiology Laboratories?" *Journal of Clinical Microbiology*, edited by David W. Warnock, vol. 55, no. 2, Feb. 2017, pp. 638–40, doi:10.1128/JCM.02202-16.
- Neppelenbroek, KH, et al. "Identification of *Candida* Species in the Clinical Laboratory: A Review of Conventional, Commercial, and Molecular Techniques." *Oral Diseases*, vol. 20, no. 4, May 2014, pp. 329–44, doi:10.1111/odi.12123.
- Oviaño, Marina, et al. "Universal Protocol for the Rapid Automated Detection of Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacilli Directly from Blood Cultures by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF/MS)." *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 48, no. 6, Dec. 2016, pp. 655–60, doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.08.024.
- Posteraro, Brunella, et al. "MALDI-TOF Mass Spectrometry in the Clinical Mycology Laboratory: Identification of Fungi and Beyond." *Expert Review of Proteomics*, vol. 10, no. 2, Apr. 2013, pp. 151–64, doi:10.1586/ep.13.8.
- Posteraro, Brunella, and Maurizio Sanguinetti. "The Future of Fungal Susceptibility Testing." *Future Microbiology*, vol. 9, no. 8, Aug. 2014, pp. 947–67, doi:10.2217/fmb.14.55.
- Ruiz-Gaitán, Alba Cecilia, et al. "Molecular Identification of *Candida auris* by PCR Amplification of Species-Specific GPI Protein-Encoding Genes." *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 308, no. 7, Oct. 2018, pp. 812–18, doi:10.1016/j.ijmm.2018.06.014.
- Sandhu, Raminder, et al. "Increased Role of Nonalbicans *Candida*, Potential Risk Factors, and Attributable Mortality in Hospitalized Patients." *Journal of Health Research and Reviews*, vol. 4, no. 2, 2017, p. 78, doi:10.4103/2394-2010.208115.
- Song, Ge, et al. "Fungal Co-Infections Associated with Global COVID-19 Pandemic: A Clinical and Diagnostic Perspective from China." *Mycopathologia*, vol. 185, no. 4, Aug. 2020, pp. 599–606, doi:10.1007/s11046-020-00462-9.
- Vásquez C, Jorge Alberto, et al. "Actualización En Caracterización Molecular de Levaduras de Interés Industrial." *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. 18, no. 2, July 2016, p. 129, doi:10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61530.
- Vatanshenassan, Mansoureh, et al. "*Candida auris* Identification and Rapid Antifungal Susceptibility Testing Against Echinocandins by MALDI-TOF MS." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 9, Feb. 2019, doi:10.3389/fcimb.2019.00020.

Vázquez Dominguez, Débora. *Efecto de La Terapia Fotodinámica Sobre Levaduras Del Género Candidatle*. 2019, <https://hdl.handle.net/20.500.12371/4635>.

Yang, Xiaobo, et al. "Clinical Course and Outcomes of Critically Ill Patients with SARS-CoV-2 Pneumonia in Wuhan, China: A Single-Centered, Retrospective, Observational Study." *The Lancet Respiratory Medicine*, vol. 8, no. 5, May 2020, pp. 475–81, doi:10.1016/S2213-2600(20)30079-5.

Yapar, Nur. "Epidemiology and Risk Factors for Invasive Candidiasis." *Therapeutics and Clinical Risk Management*, Feb. 2014, p. 95, doi:10.2147/TCRM.S40160.

FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS Y SENSIBILIDAD A ANTIFÚNGICOS DE *Candida albicans*, *Candida tropicalis* Y *Candida glabrata*

Data de aceite: 01/11/2021

Data de submissão: 15/10/2021

Alejandra Paula Espinosa Taxis

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla,
Puebla. Centro de Investigaciones en Ciencias
Microbiológicas. Puebla, Puebla
<https://orcid.org/0000-0002-6402-7902>

Débora Vázquez Domínguez

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla,
Puebla. Centro de Investigaciones en Ciencias
Microbiológicas. Puebla, Puebla
<https://orcid.org/0000-0002-5466-9792>

David Iván Loaiza Toscuento

Instituto Nacional de Astrofísica y Óptica
Electrónica. Coordinación de Óptica. Puebla,
Puebla
<https://orcid.org/0000-0003-1669-4900>

Teresita Spezzia Mazzocco

Instituto Nacional de Astrofísica y Óptica
Electrónica. Coordinación de Óptica. Puebla,
Puebla
<https://orcid.org/0000-0002-1203-2697>

RESUMEN: En los últimos años los padecimientos por hongos oportunistas aumentó notablemente, siendo la candidosis la micosis más frecuente, recientemente las especies de *Candida* no *albicans* incrementaron considerablemente, siendo más frecuentes que *Candida albicans*, las especies: *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis*, *Candida auris*

entre otras, las cuales pueden ocasionar desde una infección superficial hasta una infección sistémica; Sin embargo actualmente *C. albicans* parece haber retomado el dominio como agente etiológico de esta micosis oportunista. Por otra parte, el aumento de cepas resistentes a los antifúngicos se ha convertido en un problema de salud pública, con consecuencias fatales en el paciente. La candidiasis puede llegar a representar una carga significativa de infecciones en la población hospitalaria debido a que esta micosis se asocia con la formación de biopelículas, estas constituyen capas del microorganismos adheridas a las superficies bióticas o abióticas que complican el acceso de los fármacos y con ello su eliminación, se pueden formar sobre catéteres, prótesis dentales o cardiacas y otros dispositivos biomédicos, y se convierte en un foco de diseminación de la infección, entorpece las funciones propias de estos dispositivos, incrementa la estancia hospitalaria y, por ende, los costos de atención y la mortalidad. En este capítulo describiremos la formación de biopelículas y la sensibilidad a antifúngicos utilizando como modelo *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*.

PALABRAS CLAVE: Candidosis, *Candida* spp., antifúngicos, biopelículas.

BIOFILM FORMATION AND ANTIFUNGAL SENSITIVITY OF *Candida albicans*, *Candida tropicalis* AND *Candida glabrata*

ABSTRACT: In recent years, opportunistic fungal diseases have increased notably, candidosis being the most frequent mycosis, recently the

species of *Candida non albicans* increased considerably, being more frequent than *Candida albicans*, the species: *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis*, *Candida auris* among other, which can cause from a superficial to a systemic infection; However, currently *C. albicans* seems to have regained dominance as the etiological agent of this opportunistic mycosis. On the other hand, the increase in antifungal resistant strains has become a public health problem, with fatal consequences for the patient. Candidiasis can represent a significant burden of infections in the hospital population because this mycosis is associated with the formation of biofilms, these constitute layers of the microorganism adhered to biotic or abiotic surfaces that complicate the access of drugs and therefore their elimination, can form on catheters, dental or cardiac prostheses and other biomedical devices, and becomes a source of spread of infection, it hinders the functions of these devices, increases hospital stay and, therefore, costs of care and mortality. In this chapter we will describe biofilm formation and antifungal sensitivity using *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* as models.

KEYWORDS: Candidosis, *Candida* spp., antifungals, biofilms.

1 | INTRODUCCIÓN

De todas las especies de *Candida*, quince han resultado ser patogénicas para el ser humano, y especialmente han sido cinco las que representan el 90% de las candidiasis invasivas: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, y *C. tropicalis*, mientras que especies como *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. inconspicua*, *C. lusitaniae*, *C. norvegensis*, *C. kefyr*, *C. famata* y *C. rugosa* representan un grupo de especies aisladas ocasionalmente. *C. albicans* es la especie más estudiada en términos de patogenicidad y es el principal agente causal de las candidiasis superficiales y sistémica (Pappas et al.; Yapar; Silva et al.)

La candidiasis invasiva es la infección fúngica de mayor incidencia entre los pacientes hospitalizados, la tasa de mortalidad de esta llega a ser del 40% incluso después de haber suministrado un tratamiento antimicótico. La candidemia ha sido asociada a una mortalidad de hasta el 47% (Pappas et al.). Entre las levaduras, *C. albicans* era la especie predominante que representa del 35% al 60% de los aislados. Sin embargo, se están documentando cada vez más infecciones causadas por *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. krusei*, que son las especies de *Candida no albicans* más comunes identificadas en cultivos. La mayoría de *C. glabrata* y *C. krusei* presentan mayor resistencia al tratamiento con los azoles (Mora Carpio and Climaco).

1.1 *Candida albicans*

Es una levadura redonda u ovalada de 3-8 por 2-7 micras. Las diversas formas morfológicas de *C. albicans* se han asociado con el cambio de estados comensales o patógenos, puede formar blastoconidios, pseudohifas e hifas verdaderas dependiendo de la temperatura, el pH y nutrientes (Stokes et al.) Se cree que el cambio de levadura a hifas ayuda a la adhesión celular y facilita la infección de tejidos, la evasión de macrófagos y

el desarrollo de biopelículas (Verma-Gaur and Traven). El genoma de *C. albicans* está constituido por ocho pares de cromosomas homólogos cuyo tamaño en total es de 16 Mb (McManus and Coleman). *C. albicans* fermenta glucosa, galactosa y maltosa con formación de ácidos y dióxido de carbono. *C. albicans* se encuentra con frecuencia como parte de la flora microbiana normal de los humanos: boca, tubo digestivo, aparato genitourinario, lo que facilita su encuentro con la mayoría de los biomateriales implantados y las superficies del huésped (Luo and Mitchell). Macroscópicamente, en el medio agar dextrosa Sabouraud (SDA) las colonias de *C. albicans* tienen un crecimiento rápido y un aspecto liso, blanco y redondo

1.2 *Candida tropicalis*

Es una levadura diploide susceptible a los azoles aunque menos susceptible que *C. albicans*. *C. tropicalis* se ha convertido en una de las especies de *Candida* más importante al ser considerada como la segunda especie más virulenta de tal género. Afecta con frecuencia a los pacientes leucémicos y neutropénicos, tiene gran capacidad invasiva y se estima que de un 50% a un 60% de los casos, desarrollan candidiasis diseminada a diferencia de *C. albicans* que lo hacen en un 2 a 15% de los casos (Nucci and Marr). Estudios han demostrado que la producción de sus biopelículas es mayor que en *C. albicans*. Puede producir factores de virulencia tales como la adhesión a células bucales epiteliales, así como células endoteliales (Galán-Ladero et al.; Tronchin et al.), secreción de enzimas líticas como proteinasas, fosfolipasas y hemolisinas, morfogénesis (transición de brotes a hifas) y el switching fenotípico (estado blanco a opaco) (Seervai et al.). La morfología de las colonias de *C. tropicalis* en SDA es de color blanco a crema como se ve en la Figura 3, con una textura cremosa y un aspecto liso y pueden tener bordes ligeramente arrugados (Zuza-Alves et al.).

1.3 *Candida glabrata*

C. glabrata es una levadura no dimorfa que existe como blastoconidios pequeños en todas las condiciones ambientales como un patógeno. Sus blastoconidios miden de 1 a 4 μm (Fidel et al.) y no se han observado pseudohifas. Las colonias son blancas o cremas, pastosas y lisas, con un crecimiento de 3 a 5 días en medio Sabouraud. Es importante destacar que el cambio morfológico de la levadura a la forma hifal no ha sido reportado, aunque si la aparición de pseudohifas en respuesta a la falta de nitrógeno y exposición al dióxido de carbono (Kumar et al.).

2 | BIOPELÍCULAS

Antoni van Leeuwenhoek escribió por primera vez sobre biopelículas en 1683 para la Royal Society of London (Gulati and Nobile). La biopelícula fúngica es una

estructura heterogénea compuesta por hifas, pseudohifas y levaduras, se desarrolla en la interfaz entre un medio acuoso y un sólido. En las últimas dos décadas, el mayor uso de dispositivos de implantes médicos ha llevado a un aumento en la tasa de infecciones por *Candida* (Sandai et al.). Los sustratos más comunes son los catéteres, las dentaduras postizas (abióticas) y las superficies de las células de la mucosa (biótica) (Mayer et al.) Los microorganismos en este tipo de comunidad muestran tasas de crecimiento más bajas y mayor resistencia al tratamiento antimicrobiano, comportándose de manera muy diferente a las células planctónicas. El Instituto Nacional de Salud (NIH) en EUA ha señalado que las biopelículas patógenas son responsables directa o indirectamente del 80% de todas las infecciones microbianas en el ser humano (Jamal et al.), y estas varían desde infecciones de mucosas superficiales, dermatológicas hasta infecciones diseminadas con un alto índice de mortalidad, llegando a 50% en varios casos (Pereira et al.) .

2.1 Biopelículas de *Candida* spp.

La habilidad que poseen las especies de *Candida* para formar biopelículas, les permite adherirse no solo a superficies bióticas ya que estas pueden adherirse de igual forma a superficies inertes como catéteres u otros dispositivos biomédicos implantables y causar infecciones relacionadas a los mismos. Las adhesinas son proteínas responsables de la adhesión específica antes de la formación de la biopelícula. Las adhesinas de secuencia similar a la aglutinina (Als) son una familia de glucoproteínas ubicadas en la superficie de la pared celular de las levaduras, que se sabe que están asociadas con la patogenicidad; están presentes en *C. albicans* y en especies de *Candida* no *albicans* como *C. tropicalis* (Chandra and Mukherjee).

Los estudios relacionados a biopelículas de *Candida* spp han sido realizados en su mayoría sobre *C. albicans*, por lo que aún se desconoce en gran medida el proceso de formación de estas estructuras en otras especies, en la Figura 4 se muestra el proceso de formación de biopelículas para *C. albicans* y *C. tropicalis*. La formación de biopelículas para *C. albicans* es un proceso multifacético (Gulati and Nobile).

2.2 Biopelículas de *Candida* en tejidos

Las biopelículas de *Candida* pueden formarse en el tejido de las mucosas del huésped, donde reside como parte de la microflora comensal, siendo la cavidad oral el objetivo principal. La candidiasis seudomembranosa es la infección oportunista oral más común en personas VIH+ y otras personas inmunocomprometidas. Se presenta como lesiones de color blanco cremoso en el paladar, la mucosa bucal y la lengua, aunque también puede extenderse a la faringe (candidiasis orofaríngea) (Tsui et al.).

Las infecciones superficiales asociadas a biopelículas de *Candida* son menos graves, la gingivoestomatitis y la periimplantitis son dos de las manifestaciones más frecuentes. En este tipo de infecciones las biopelículas suelen ser polimicrobianas, y la

participación de microorganismos del género *Streptococcus* es frecuente. La endocarditis por *Candida* puede resultar de la formación de biopelículas en el endotelio vascular dañado de las válvulas cardíacas en pacientes con enfermedad cardíaca preexistente (Silva et al.).

2.3 Biopelículas de *Candida* en dispositivos biomédicos

Las biopelículas de *Candida* se adhieren generalmente a dispositivos biomédicos, y son capaces de resistir concentraciones altas de antifúngicos (Nett et al.). El dispositivo médico de mayor infección por estas biopelículas es el catéter venoso central comúnmente usado para la administración de líquidos, nutrientes y fármacos. La contaminación del fluido, así como la del núcleo del catéter tiene su origen en la piel del paciente o las manos del personal de enfermería al realizar la inserción del mismo, permitiendo que los organismos pueden migrar a través de la herida hecha por el catéter (Silva et al.).

2.4 Detección de biopelículas *in vitro*

Existen diferentes métodos para obtener la formación de biopelículas, los cuales pueden ser cualitativos y/o cuantitativos. Los métodos cualitativos solo ponen en evidencia la formación de las biopelículas, las cuales se pueden observar macroscópicamente y microscópicamente

Hemos realizado la formación de biopelículas con *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*, cepas tipo y obtenidas de pacientes a través de dos técnicas. En la primera técnica se emplearon tubos tipo Falcon de 15 mL, conteniendo 10 mL de caldo glucosa peptona extracto de levadura, se inocularon con 1×10^6 levaduras de cada especie, incubando durante 48 horas/37°C, posteriormente se agregaron 2 mL de cristal violeta al 0.5%, para realizar la cuantificación de las biopelículas formadas, realizando las lecturas en espectrofotómetro a 595 nm.

En la segunda técnica colocamos 200 μ L de una suspensión de 1×10^7 lev/mL, por triplicado en placas de poliestireno de 96 pocillos, incubando a 30°C en agitación a 90 RPM por 48 h, agregando a las 24 h la cantidad suficiente de caldo glucosa Sabouraud, ó YPD para un volumen final de 200 μ L en cada pocillo, transcurridas las 48 h se depositaron 40 μ l de una solución de cristal violeta al 0.5% para cuantificar la formación de las biopelículas en espectrofotómetro a 595 nm.

Al microscopio se pueden observar redes de levaduras hifas y micelios (**Figura 1**).

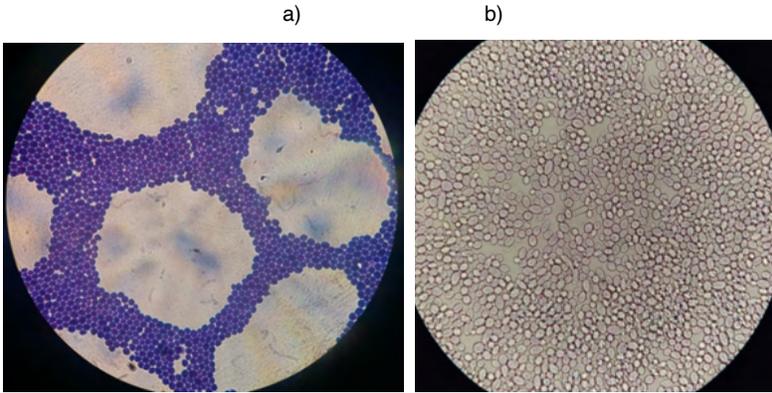


Figura 1. *C. albicans* mostrando levaduras en la formación de biopelículas a las 48 horas de incubación. a) teñida con la técnica de Gram b) sin teñir.

3 I ANTIFÚNGICOS EN LAS INFECCIONES POR *CANDIDA*

El tratamiento recomendado para las infecciones por *Candida* incluye en primera instancia el uso de equinocandinas, anfotericina B, seguido de las terapias orales con azoles, así también, los polienos son otro tipo de antifúngicos que se han empleado en este tipo de tratamiento (de Barros et al.; Silva et al.; McCarty et al.).

- Azoles (fluconazol, posaconazol, voriconazol). Bloquean la síntesis del ergosterol, inhibiendo la enzima 14 α -lanosterol demetilasa, encargada de la síntesis del ergosterol en la membrana celular, inhibiendo así el crecimiento y la replicación fúngica (ODDS).
- Polienos (anfotericina B y nistatina). Se intercalan en membranas que contienen ergosterol, creando poros que destruyen el gradiente de protones, lo que resulta en la salida del citoplasma y otros contenidos celulares (Quiles-Melero and García-Rodríguez).
- Equinocandinas (caspofungina, micafungina y anidulafungina). Interrumpen la síntesis de la enzima β 1,3-D-glucano-sintetasa, componente de la pared celular de las especies de *Candida* (Petrikkos and Skiada).
- Anfotericina B. Se une al ergosterol de la membrana fúngica creando poros que permiten que los iones se difundan a través de la membrana. Debido a su hidrofobicidad y pobre absorción gastrointestinal, se administra de forma intravenosa (ODDS). Su nefrotoxicidad se ha minimizado en los últimos años con las formulaciones lipídicas que presentan mejor solubilidad (Schlottfeldt et al.).

Si bien hay diferentes tratamientos, aún no se ha encontrado una solución definitiva, por lo que se han desarrollado y probado otras alternativas, como el uso combinado de las equinocandinas y la forma liposomal de la anfotericina B, misma que sigue en estudios y está relacionada a la producción de nefrotoxicidad (Adler-Moore et al.; Kuse et al.; Queiroz-Telles et al.).

El tratamiento para combatir la candidiasis puede ser tópico o sistémico según el tipo de infección, los antifúngicos más utilizados son los derivados imidazólicos (fluconazol, itraconazol, ketoconazol, miconazol etc.), sin embargo en la actualidad se observa una disminución en la efectividad de estos, debido principalmente, al surgimiento de levaduras resistentes, a la aparición de nuevas especies patógenas, a la prescripción irracional de antimicóticos como profilaxis y al aumento de las dosis terapéutica (Arendrup and Patterson).

Los antimicóticos pueden ser fungistáticos o fungicidas según inhiban el crecimiento o produzcan lisis de los hongos. Los derivados imidazólicos inhiben las enzimas oxidativas asociadas al citocromo P450 [CYP 3A4 y CYP 2C9] (lanosterol 14- α desmetilasa), bloqueando la conversión de lanosterol en ergosterol, lo que produce una alteración en la permeabilidad de la membrana de las células fúngicas. Además, promueven la acumulación de peróxido de hidrógeno, capaz de lesionar la estructura de los organelos intracelulares del hongo (López et al.). Estudios recientes han documentado tasas crecientes de resistencia al fluconazol, especialmente en *C. auris*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* (Pemán and Quindós; Duxbury et al.).

3.1 Prueba de sensibilidad a antifúngicos

Para realizar la prueba de sensibilidad contra antifúngicos se tomaron cepas de *C. glabrata*, se cultivaron en medio YPD, de la cual se tomó una pequeña porción y se llevó a un tubo con solución fisiológica estéril hasta conseguir una concentración de 1×10^6 Lev / ml utilizando el tubo #5 de Mc Farland, con la ayuda de un hisopo impregnado de la solución anterior se colocó en placas de agar Mueller Hinton, y se realizó un estriado masivo, se esperó 5 a 10 minutos hasta secarse, y se colocaron sensibilizadores de Fluconazol (FCA) BIO RAD 50 μ g, Ketoconazol (KET) BIO RAD 50 μ g, Anfotericina B (AB) BIO RAD 100 μ g con pinzas esterilizadas previamente con alcohol, se colocó además un control con papel filtro más solución fisiológica, finalmente se presionaron los discos ligeramente sobre el agar para asegurar un contacto y se incubaron las placas de forma invertida por 48 a 72 h hasta su lectura para observar halos definidos según el inserto.

En el segundo método los ensayos de resistencia/susceptibilidad a los antifúngicos principalmente utilizados en la terapéutica, se realizaron utilizando el kit comercial ATB Fungus III de Biomeriux. Esta técnica se basa en galerías donde existen cúpulas con distintas concentraciones de los siguientes antifúngicos: 5-FC; AMB; ITR; FCA; VRC.

A partir de levaduras cultivadas en agar Dextrosa Sabouraud, se toma una porción del cultivo para realizar suspensiones de las distintas cepas con agua destilada estéril, igualando al tubo 2 del nefelómetro de McFarland, se transfirieron 20 ml a las ámpulas de medio que contiene el mismo kit mezclando suavemente, para inocular 135 ml en cada una de las cúpulas de la galería, posteriormente se incubó a 37°C por 24 horas, en cámara húmeda para evitar deshidratación de las muestras. Las lecturas se realizan a las 24 horas, indicando presencia o ausencia de turbidez. Si la cúpula presenta turbidez, la muestra

es resistente al antifúngico en cuestión con la concentración que marca dicha cúpula. La ausencia de turbidez pone de manifiesto la susceptibilidad al antifúngico a la concentración que se observa en la cúpula de la galería del kit (**Figura 2**).

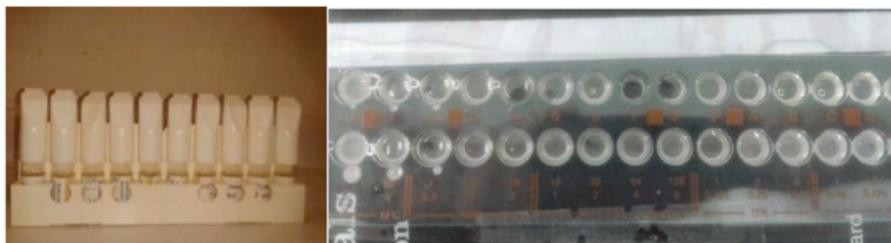


Figura 2. A la izquierda las ámpulas de medio del kit ATB Fungus III. Ala derecha una galería con sus cúpulas ya inoculadas y listas para tomar la lectura visual (presencia/ausencia turbidez) del mismo kit.

Con el inserto del kit (indicaciones) se determina la CMI que presentan las cepas, siendo la CMI aquella concentración del antifúngico donde se deja de observar crecimiento (turbidez); y con ayuda der tablas del CLSI referidas en el mismo inserto se concluye si la cepa es susceptible o resistente a ese antifúngico. En las pruebas de sensibilidad a antifúngicos se puede observar que todas las cepas aisladas de pacientes de las 3 especies evaluadas (*C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*) mostraron resistencia a diferentes azoles (**Tabla 1**). Así como también las cepas de referencia *C. albicans* CAF2 y *C. glabrata* ATCC2001. Solo la cepa de referencia *C. tropicalis* MYA3404 mostró sensibilidad a los fármacos probados.

<i>Candida albicans</i>														
Antifúngico	Muestra	CAF2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Ket		Rs	Rs	Rs	Se	Se	Rs	Se	Rs	In	Rs	In	Se
Fca		Rs	Rs	Rs	Rs	Rs	Rs	Rs	Rs	Rs	Rs	Rs	Rs	Rs
Ctr		Se	Se	Se	Se	Se	Se	Se	Rs	Rs	Se	Rs	In	In
AB		Se	Se	Se	Se	Se	Se	Se	Se	Se	Se	Se	Se	Se
<i>Candida tropicalis</i>														
Perfil de Sensibilidad o Resistencia														
Antifúngico	Muestra	MYA 3404	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Ket		Se	Se	Se	Se	Se	Rs	Se	Se	Se	In	Se	Se
Fca		Se	Rs	Rs	Rs	Rs	Rs	Se	Se	Se	Se	Se	Re	Re
Ctr		Se	Se	Se	Se	Se	Se	Se	In	In	In	Se	Re	Re
AB		Se	Se	Se	Se	Se	Se	Se	Se	Se	Se	Se	Se	Se

Candida glabrata													
Perfil de Sensibilidad o Resistencia													
Antifúngico \ Muestra	ATCC 2001	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ket	Rs	Se	Re	Re	In	Re	Se	Se	Rs	Se	Se	In	Se
Fca	Rs	Rs	In	In	Se	In	Se	Se	Rs	Se	Se	Re	Se
Ctr	Se	Se	Se	Se	Se	Se	Se	In	Rs	Se	Se	In	In
AB	Se	Se	Se	Se	Se	Se	Se	Se	Se	Rs	Se	Se	Se

Tabla 1. Resultados de sensibilidad a antifúngicos de cepas de *Candida* spp.

4 | CONCLUSIONES

Todos los cultivos de *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. albicans* formaron biopelículas, y fueron sensible a anfotericina B, siendo sensibles a ketoconazol, fluconazol, clotrimazol la mayoría de los aislados.

REFERENCIAS

Adler-Moore, Jill, et al. "Preclinical Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Antifungal Activity of Liposomal Amphotericin B." *Clinical Infectious Diseases*, vol. 68, no. Supplement_4, May 2019, pp. S244–59, doi:10.1093/cid/ciz064.

Arendrup, Maiken Cavling, and Thomas F. Patterson. "Multidrug-Resistant *Candida*: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment." *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 216, no. suppl_3, Aug. 2017, pp. S445–51, doi:10.1093/infdis/jix131.

Chandra, Jyotsna, and Pranab K. Mukherjee. "Candida Biofilms: Development, Architecture, and Resistance." *Microbiology Spectrum*, edited by Mahmoud Ghannoum et al., vol. 3, no. 4, July 2015, doi:10.1128/microbiolspec.MB-0020-2015.

de Barros, Patrícia Pimentel, et al. "Candida Biofilms: An Update on Developmental Mechanisms and Therapeutic Challenges." *Mycopathologia*, vol. 185, no. 3, June 2020, pp. 415–24, doi:10.1007/s11046-020-00445-w.

Duxbury, Sarah J. N., et al. "Evolution of Drug-Resistant and Virulent Small Colonies in Phenotypically Diverse Populations of the Human Fungal Pathogen *Candida Glabrata*." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 287, no. 1931, July 2020, p. 20200761, doi:10.1098/rspb.2020.0761.

Fidel, Paul L., et al. "Candida Glabrata : Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. Albicans*." *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 12, no. 1, Jan. 1999, pp. 80–96, doi:10.1128/CMR.12.1.80.

Galán-Ladero, M. A., et al. "Determination of Biofilm Production by *Candida Tropicalis* Isolated from Hospitalized Patients and Its Relation to Cellular Surface Hydrophobicity, Plastic Adherence and Filamentation Ability." *Yeast*, vol. 30, no. 9, Sept. 2013, pp. 331–39, doi:10.1002/yea.2965.

Gulati, Megha, and Clarissa J. Nobile. "Candida Albicans Biofilms: Development, Regulation, and Molecular Mechanisms." *Microbes and Infection*, vol. 18, no. 5, May 2016, pp. 310–21, doi:10.1016/j.micinf.2016.01.002.

Jamal, Muhsin, et al. "Bacterial Biofilm and Associated Infections." *Journal of the Chinese Medical Association*, vol. 81, no. 1, Jan. 2018, pp. 7–11, doi:10.1016/j.jcma.2017.07.012.

Kumar, Kundan, et al. "Candida Glabrata: A Lot More Than Meets the Eye." *Microorganisms*, vol. 7, no. 2, Jan. 2019, p. 39, doi:10.3390/microorganisms7020039.

Kuse, Ernst-Rüdiger, et al. "Micafungin versus Liposomal Amphotericin B for Candidaemia and Invasive Candidosis: A Phase III Randomised Double-Blind Trial." *The Lancet*, vol. 369, no. 9572, May 2007, pp. 1519–27, doi:10.1016/S0140-6736(07)60605-9.

López, Karina, et al. "Mecanismos de Resistencia Antifúngica de Los Azoles En Candida." *Rev Biomed*, vol. 27, no. 490, 2016, pp. 127–36, <https://aulavirtual.unap.edu.pe/2020i/course/view.php?id=1464>.

Luo, Guizhen, and Thomas G. Mitchell. "Rapid Identification of Pathogenic Fungi Directly from Cultures by Using Multiplex PCR." *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 40, no. 8, Aug. 2002, pp. 2860–65, doi:10.1128/JCM.40.8.2860-2865.2002.

Mayer, François L., et al. "Candida Albicans Pathogenicity Mechanisms." *Virulence*, vol. 4, no. 2, Feb. 2013, pp. 119–28, doi:10.4161/viru.22913.

McCarty, Todd P., et al. "Echinocandin Resistance among Candida Isolates at an Academic Medical Centre 2005–15: Analysis of Trends and Outcomes." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 73, no. 6, June 2018, pp. 1677–80, doi:10.1093/jac/dky059.

McManus, Brenda A., and David C. Coleman. "Molecular Epidemiology, Phylogeny and Evolution of Candida Albicans." *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 21, Jan. 2014, pp. 166–78, doi:10.1016/j.meegid.2013.11.008.

Mora Carpio, Andres L., and Antonette Climaco. "Fungemia Candidiasis." *StatPearls*, 2021, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28613783>.

Nett, Jeniel E., et al. "Host Contributions to Construction of Three Device-Associated Candida Albicans Biofilms." *Infection and Immunity*, edited by G. S. Deepe, vol. 83, no. 12, Dec. 2015, pp. 4630–38, doi:10.1128/IAI.00931-15.

Nucci, M., and K. A. Marr. "Emerging Fungal Diseases." *Clinical Infectious Diseases*, vol. 41, no. 4, Aug. 2005, pp. 521–26, doi:10.1086/432060.

ODDS, FRANK C. "Antifungal Agents: Their Diversity and Increasing Sophistication." *Mycologist*, vol. 17, no. 2, May 2003, pp. 51–55, doi:10.1017/S0269915X03002064.

Pappas, Peter G., et al. "Invasive Candidiasis." *Nature Reviews Disease Primers*, vol. 4, no. 1, June 2018, p. 18026, doi:10.1038/nrdp.2018.26.

Pemán, Javier, and Guillermo Quindós. "Aspectos Actuales de Las Enfermedades Invasoras Causadas Por Candida y Otros Hongos Levaduriformes." *Revista Iberoamericana de Micología*, vol. 33, no. 3, July 2016, pp. 133–39, doi:10.1016/j.riam.2015.10.001.

Pereira, R., et al. "Biofilm of *Candida Albicans* : Formation, Regulation and Resistance." *Journal of Applied Microbiology*, vol. 131, no. 1, July 2021, pp. 11–22, doi:10.1111/jam.14949.

Petrikkos, George, and Anna Skiada. "Recent Advances in Antifungal Chemotherapy." *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 30, no. 2, Aug. 2007, pp. 108–17, doi:10.1016/j.ijantimicag.2007.03.009.

Queiroz-Telles, Flavio, et al. "Micafungin Versus Liposomal Amphotericin B for Pediatric Patients With Invasive Candidiasis." *Pediatric Infectious Disease Journal*, vol. 27, no. 9, Sept. 2008, pp. 820–26, doi:10.1097/INF.0b013e31817275e6.

Quiles-Melero, Inmaculada, and Julio García-Rodríguez. "Antifúngicos de Uso Sistémico." *Revista Iberoamericana de Micología*, vol. 38, no. 2, Apr. 2021, pp. 42–46, doi:10.1016/j.riam.2021.04.004.

Sandai, Doblin, et al. "Resistance of *Candida Albicans* Biofilms to Drugs and the Host Immune System." *Jundishapur Journal of Microbiology*, vol. 9, no. 11, Sept. 2016, doi:10.5812/jjm.37385.

Schlottfeldt, Fábio dos Santos, et al. "Prevenção Da Nefrotoxicidade Da Anfotericina B Por Meio Do Uso de Fitomedicamentos." *Revista Da Escola de Enfermagem Da USP*, vol. 49, no. spe, Dec. 2015, pp. 74–79, doi:10.1590/S0080-623420150000700011.

Seervai, Riyad N. H., et al. "Parasexuality and Ploidy Change in *Candida Tropicalis*." *Eukaryotic Cell*, vol. 12, no. 12, Dec. 2013, pp. 1629–40, doi:10.1128/EC.00128-13.

Silva, Sónia, et al. "*Candida* Species Biofilms' Antifungal Resistance." *Journal of Fungi*, vol. 3, no. 1, Feb. 2017, p. 8, doi:10.3390/jof3010008.

Stokes, C., et al. "Lower Filamentation Rates of *Candida Dubliniensis* Contribute to Its Lower Virulence in Comparison with *Candida Albicans*." *Fungal Genetics and Biology*, vol. 44, no. 9, Sept. 2007, pp. 920–31, doi:10.1016/j.fgb.2006.11.014.

Tronchin, Guy, et al. "Adherence Mechanisms in Human Pathogenic Fungi." *Medical Mycology*, vol. 46, no. 8, Jan. 2008, pp. 749–72, doi:10.1080/13693780802206435.

Tsui, Christina, et al. "Pathogenesis of *Candida Albicans* Biofilm." *Pathogens and Disease*, edited by Harry Mobley, vol. 74, no. 4, June 2016, p. ftw018, doi:10.1093/femspd/ftw018.

Verma-Gaur, Jiyoti, and Ana Traven. "Post-transcriptional Gene Regulation in the Biology and Virulence of *Candida Albicans*." *Cellular Microbiology*, vol. 18, no. 6, June 2016, pp. 800–06, doi:10.1111/cmi.12593.

Yapar, Nur. "Epidemiology and Risk Factors for Invasive Candidiasis." *Therapeutics and Clinical Risk Management*, Feb. 2014, p. 95, doi:10.2147/TCRM.S40160.

Zuza-Alves, Diana L., et al. "An Update on *Candida Tropicalis* Based on Basic and Clinical Approaches." *Frontiers in Microbiology*, vol. 8, Oct. 2017, doi:10.3389/fmicb.2017.01927.

SOBRE A ORGANIZADORA

DANIELA REIS JOAQUIM DE FREITAS - Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2000), com mestrado em Biologia Celular e Molecular (2002), doutorado em Ciências (2006) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Durante o mestrado e o doutorado trabalhou diretamente com biologia celular e molecular e bioquímica, na clonagem e expressão de genes do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Também trabalhou com morte celular e estresse oxidativo no carrapato. Fez pós-doutorado na área de Ciências Médicas - Farmacologia (2007) na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Atualmente é professora e líder do Grupo de Estudos em Microbiologia e Parasitologia (NUEMP) no Departamento de Parasitologia e Microbiologia, e membro do Núcleo de Pesquisa em Prevenção e Controle de Infecções em Serviços de Saúde (NUPCISS) na Universidade Federal do Piauí. Também é docente permanente do Programa de Pós-Graduação em Enfermagem (PPGEnf-UFPI). Tem experiência nas áreas de Biologia Celular e Molecular, Imunologia, Parasitologia, Microbiologia e Farmacologia Experimental e tem linhas de pesquisa em Controle de Infecções em Serviços de Saúde, Infecções comunitárias e Educação em Saúde.

ÍNDICE REMISSIVO

A

- Ação antibacteriana 3, 29
Alimentos fermentados 61, 62, 63, 64
Alpinia zerumbet 50, 51, 58, 59
Antifúngicos 82, 93, 97, 98, 99, 100, 101, 103
Application 11, 12, 24, 36, 46, 48, 51, 59, 81
Astrocaryum aculeatum 9, 27, 28, 29, 34
Avaliação físico-química 68, 73, 75
Avaliação microbiológica 68, 70, 71, 73, 74, 77, 79

B

- Barras de cereais 68, 71, 73, 74, 75, 76, 77, 78
Biocatalisadores 11, 13, 14, 48
Biopelículas 93, 95, 96, 97, 98, 101
Biotechnology 24, 36, 46, 47, 48, 66, 90

C

- Candida albicans* 32, 81, 93, 94, 100, 102, 103
Candida glabrata 81, 93, 94, 95, 101, 102
Candida spp. 80, 81, 83, 93, 94, 96, 101
Candida tropicalis 81, 93, 94, 95, 100, 101, 103
Castanha-do-Brasil 68, 69, 70, 71, 74, 76, 77, 78, 79

E

- Enzimas 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 32, 36, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 48, 56, 63, 95, 99
Enzymes 11, 12, 15, 24, 26, 34, 36, 47, 48
Escherichia coli 1, 2, 27, 28, 29, 59, 68, 69, 70, 71, 73, 74
Extratos metanólicos 1, 2, 3, 5, 6, 28, 29, 31, 33

F

- Fungos 4, 18, 21, 24, 25, 37, 46, 50, 56, 61, 64, 71, 75, 78

I

- Indústria alimentícia 11, 12, 18, 20, 21, 23, 42
Infecções 3, 20, 51, 52, 104

K

Klebsiella pneumoniae 1, 2, 27, 28, 29

L

Linhagens de bactérias 61

Lipase 16, 25, 36, 40, 41, 45, 46, 47, 48

M

MALDITOF 80, 81, 83, 84, 85, 86, 89

Microrganismos 3, 5, 6, 8, 14, 18, 20, 21, 23, 24, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 37, 44, 50, 54, 61, 62, 63, 64, 70, 71, 75, 77, 84

O

Óleo essencial 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59

P

Potencial antimicrobiano 50

Processos industriais 11, 12, 14, 20, 23

Pseudomonas aeruginosa 1, 2, 27, 28, 29, 41

S

Staphylococcus aureus 1, 2, 3, 27, 28, 29, 59, 65

T

Tucumã 9, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34

Turnera subulata 1, 2, 10



MICROBIOLOGIA:

Avanços através dos séculos e constante atualizações tecnológicas

www.atenaeditora.com.br 

contato@atenaeditora.com.br 

[@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora) 

www.facebook.com/atenaeditora.com.br 


Ano 2021

MICROBIOLOGIA:

Avanços através dos séculos e constante atualizações tecnológicas

www.atenaeditora.com.br 

contato@atenaeditora.com.br 

[@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora) 

www.facebook.com/atenaeditora.com.br 

 **Atena**
Editora
Ano 2021