

Jean César Farias de Queiroz | org.

Avanços em Biotecnologia e Bioprocessos

vol. 1



JEAN CÉSAR FARIAS DE QUEIROZ | ORG.



Avanços em Biotecnologia e Bioprocessos

vol. 1



CAMPINA GRANDE - PB
2022

A946 Avanços em biotecnologia e bioprocessos [livro eletrônico] / Jean César Farias de Queiroz (organizador). – Campina Grande: EDUEFG, 2022.
289 p.

E-book (PDF)
ISBN 978-65-86302-75-2

1. Biotecnologia. 2. Bioprocessos. 3. Biomateriais. 4. Metabólitos Secundários. I. Queiroz, Jean César Farias de. II. Título.

CDU 61:62(07)

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECÁRIA SEVERINA SUELI DA SILVA OLIVEIRA CRB-15/225

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE – UFG
EDITORA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE - EDUEFG
secretaria@editora.ufcg.edu.br

Prof. Dr. Antônio Fernandes Filho
Reitor

Prof. Dr. Mario Eduardo Rangel Moreira Cavalcanti Mata
Vice-Reitor

Prof. Dr. Patrício Borges Maracajá
Diretor Administrativo da Editora da UFG

Prof. Anselmo Ribeiro Lopes
Assessor da Editora da UFG

Simone Cunha
Revisão

Yasmine Lima
Diagramação

CONSELHO EDITORIAL

Anubes Pereira de Castro (CFP)
Benedito Antônio Luciano (CEEI)
Erivaldo Moreira Barbosa (CCJS)
Janiro da Costa Rego (CTRN)
Marisa de Oliveira Apolinário (CES)
Marcelo Bezerra Grilo (CCT)
Naelza de Araújo Wanderley (CSTR)
Railene Hérica Carlos Rocha (CCTA)
Rogério Humberto Zeferino (CH)
Valéria Andrade (CDSA)

SUMÁRIO

AVALIAÇÃO SINTOMATOLÓGICA NA INTERAÇÃO <i>BEGOMOVIRUS-SOLANUM LYCOPERSICUM</i> E DETECÇÃO VIA PCR COM MARCADORES ESPECÍFICOS	7
INIBIÇÃO DA ENZIMA NS5 RDRP <i>IN SILICO</i> EVIDENCIA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIVIRAL DA QUECERTINA E DO LINALOL CONTRA O VÍRUS DA ZIKA	39
EFEITOS DA RETICULAÇÃO COM GENIPINA EM MEMBRANAS DE QUITOSANA/COLÁGENO PARA POTENCIAL USO COMO BIOMATERIAL	61
AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE QUITOSANA NA POROSIDADE E RESISTÊNCIA DE MICROESFERAS DE ALGINATO/QUITOSANA PARA IMOBILIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS E POSTERIOR USO NO TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS	93
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBIÓTICA E ANTIPROLIFERATIVA TUMORAL DAS FRAÇÕES PURÍFICAS DA URTIGA <i>CNIDOSCOLUS URENS</i>	127
ALCALOIDES DE <i>ERITHRINA VELUTINA WILD</i>: CARACTERIZAÇÃO POR CROMATOGRAFIA GASOSA E LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS	153
AVALIAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO NA PRODUÇÃO DE AGUARDENTE DE SERIGUELA (<i>SPONDIAS PURPUREA</i>)	183
CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE <i>MYRACRODRUON URUNDEUVA</i> (AROEIRA-DO-SERTÃO) E POTENCIAL ANTIOXIDANTE	213

AVALIAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO NA OBTENÇÃO DO DESTILADO DE MANGABA (<i>HANCORNIA SPECIOSA</i>)	243
POTENCIAL DA BAICALINA COMO ANTÍDOTO PARA A RICINA	269

AVALIAÇÃO SINTOMATOLÓGICA NA INTERAÇÃO *BEGOMOVIRUS-SOLANUM LYCOPERSICUM* E DETECÇÃO VIA PCR COM MARCADORES ESPECÍFICOS

Laura Araújo da Silva Amorim

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia
Araraquara – SP–laura.a.5@hotmail.com

Ana Verônica Silva do Nascimento

Universidade Federal de Campina Grande – UFCG
Unidade Acadêmica de Biotecnologia e Bioprocessos
Sumé – PB–anaveronicasn@gmail.com

Laedson Enéas Cavalcante

Universidade Federal de Campina Grande – UFCG
Programa de Pós-Graduação de Engenharia Química–PPGEQ
Campina Grande – PB–laedson.cavalcante@hotmail.com

Leidson Allan Ferreira de Lucena

Universidade Federal de Campina Grande – UFCG
Unidade Acadêmica de Biotecnologia e Bioprocessos
Sumé – PB–allanferreira84@hotmail.com

INTRODUÇÃO

A cultura do tomateiro, *Solanum lycopersicum* L., é originário da parte ocidental da América do Sul. É uma das olerícolas de maior importância econômica, sendo também uma das mais difundidas no mundo, devido a sua grande aceitabilidade e consumo.¹ No Brasil, a cultura do tomateiro para consumo *in natura* tem sido uma importante fonte de renda e ocupação de mão de obra rural. O tomate pode ser cultivado em regiões tropicais e subtropicais no mundo inteiro, tanto para consumo *in natura*, no

cultivo tutorado, como para a indústria de processamento, através do cultivo rasteiro.²

No Nordeste brasileiro, a área utilizada para a produção dessa cultura é correspondente a 21% da área nacional, aproximando-se da área produtora do estado de Goiás, correspondente a 24,7%. No entanto, enquanto em Goiás a produtividade é por volta de 31,8% da produção total, o Nordeste apresenta uma produtividade de 12,8%.³ O cultivo de tomate no Nordeste brasileiro se apresenta como uma atividade agrícola de expressiva importância socioeconômica.⁴ Já no estado da Paraíba, a produção corresponde a 0,3%, com uma área de 0,8% do total, sendo um valor muito abaixo da média nacional.³

Devido às condições edafoclimáticas favoráveis e à incorporação de novas tecnologias, o Estado do Paraíba tem se apresentado promissor no cultivo do tomate. Entretanto, com a expansão da área cultivada, foram observadas perdas significativas em todas as áreas produtoras, a maioria por problemas fitossanitários.⁵ Dentre os problemas fitossanitários na cultura do tomateiro, destacam-se as doenças causadas por vírus, que podem variar amplamente em termos de severidade, incluindo respostas tolerantes que pouco alteram a fisiologia da planta hospedeira; até respostas severas, que podem culminar com a morte da planta. Medidas de controle, na maioria das vezes, não são eficientes.⁶ Vários são os vírus que podem infectar a cultura do tomate, entretanto, os *Geminivirus* possuem grande importância econômica, devido às perdas ocasionadas à agricultura.⁷ A interação *Geminivirus*-tomate inicia-se geralmente com clareamento acentuado nas nervuras foliares, acentuando manchas cloróticas na forma de mosqueado e um intenso mosaico amarelo. Quando a infecção ocorre precocemente, a planta tem seu crescimento e desenvolvimento paralisado.⁸ Um dos gêneros de maior importância da família *geminiviridae*, sendo o maior deles, é o gênero *Begomovirus*.⁹

A ocorrência de epidemias cada vez mais severas de begomovirose, aliada à dificuldade de controle dessa doença, faz com que ela seja considerada um dos maiores problemas fitossanitários da cultura do tomateiro¹. Os *Begomovirus* apresentam uma grande variabilidade de espécies, sendo que as espécies encontradas no Brasil não são relatadas em outros países, sugerindo que estes sejam nativos.¹

Além da diversidade de espécies virais encontradas em tomateiro e a alta incidência de diferentes viroses, o maior problema que os agricultores possuem em relação às viroses é o seu controle, já que não há como controlar as viroses sem causar algum dano à planta hospedeira.¹¹ Assim, uma boa medida no controle de doenças causadas por vírus no campo depende de diagnóstico preciso e de um manejo efetivo da praga.

No diagnóstico de viroses vegetais, são utilizados métodos biológicos, sorológicos e moleculares. Uma premissa básica para auxiliar o diagnóstico de vírus são os estudos de incidência no campo. Entretanto, uma simples observação visual de sintomas de incidência de vírus em plantio de tomateiro no campo não é suficiente para atestar a presença desses vírus, uma vez que os sintomas podem ser facilmente confundidos com os causados por desequilíbrios nutricionais, diferenças varietais e infecção por outros vírus. Nesse contexto, surgem para auxiliar no diagnóstico os métodos moleculares, através da reação de polimerização em cadeia (PCR), o que acelera o desenvolvimento de novas classes de marcadores moleculares.¹²

SOLANUM LYCOPERSICUM

Pertencente à família *Solanaceae*, o tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma planta pilosa e herbácea que, quando jovem, possui caule flexível, tornando-se fibroso com o passar do tempo.

Apresenta dois hábitos de crescimento que podem ser indeterminado e determinado. Nas cultivares de hábito indeterminado, as plantas são tutoradas e desbrotadas, e os frutos são destinados diretamente ao consumo humano. Já no cultivo de hábito determinado, as plantas são adaptadas para cultivo rasteiro e são destinadas a agroindústrias.¹³ O melhor desempenho das plantas é observado em temperaturas diurnas de 18°C a 25°C; e noturnas de 13°C a 24°C², sendo preferível realizar o plantio em regiões ou épocas de temperaturas amenas.¹⁴ Segundo estudos realizados anteriormente, o número de flores e o pigmento do fruto podem ser afetados de acordo com as condições ambientais às quais a planta está submetida, sendo intimamente influenciadas por temperaturas acima ou abaixo dos limites recomendados para seu cultivo, fazendo com que a qualidade e a quantidade dos frutos sejam afetadas².

Originário da América do Sul, mais precisamente onde hoje são localizados Peru, Chile e Equador, o tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das culturas mais difundidas no mundo, devido a sua grande aceitabilidade e consumo.¹ O tomateiro apresenta grande importância econômica, social e nutricional. Sua importância econômica vem do valor de produção arrecadado; a importância social se dá pelos empregos diretos e indiretos que o seu cultivo gera;¹⁵ já nutricionalmente, o tomate e seus produtos são uma fonte rica em vitamina C, provitamina A (betacaroteno) e antioxidantes (licopeno e outros carotenoides),¹⁴ além de ser rico em glicose, frutose, lipídeo, proteína e sais minerais, como fósforo, cálcio, potássio e magnésio.¹⁵

Sendo uma das hortaliças mais difundidas mundialmente, o tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é, principalmente, cultivado nas regiões tropicais e subtropicais do mundo.¹⁴ Acredita-se que o cultivo do tomateiro teve início na Itália, por volta de 1550, levando a crer que os italianos foram os primeiros a utilizá-lo na

alimentação humana no século XVIII.¹⁶ No Brasil, o tomate foi introduzido no final do século XIX através dos imigrantes europeus.¹³ O Brasil ocupa a nona posição de maior produção de tomate, com uma produção aproximada de 4,15 milhões de toneladas por ano. Com 1,04 milhão de toneladas produzidas anualmente, o estado de São Paulo é o maior produtor do país.¹⁷

O tomate é uma hortaliça que faz parte, diariamente, da alimentação da maioria da população brasileira. Dentre as hortaliças, é uma das mais importantes, não somente no âmbito produtivo, mas também em valor socioeconômico. Sua cultura é formada por duas cadeias produtivas distintas, caracterizadas pelo segmento de mesa, destinado ao consumo *in natura*, e a fins industriais. Cada cadeia produtiva possui características intrínsecas na produção, no beneficiamento, no processamento e na comercialização.²

Nos últimos anos, a cultura do tomate tem obtido ganhos com o melhoramento genético,² em que foram priorizadas características relacionadas ao aumento de produtividade, dando pouca atenção às defesas físicas (*e.g.* pilosidade) e químicas (metabólitos secundários tóxicos a herbívoros) da planta. Por isso, as variedades utilizadas no cultivo são susceptíveis a insetos e doenças, dificultando a produção em sistemas orgânicos.⁵ Para reverter esta situação, diferentes espécies do gênero *Solanum* vêm sendo utilizadas em programas de melhoramento genético, visando à introdução de genes que conferem resistência a pragas e doenças, melhoria da qualidade nutricional dos frutos e tolerância a estresses abióticos.¹⁸ Porém, apesar das melhorias genéticas ocorridas no tomate, a planta é suscetível ainda a pragas como, por exemplo, broca-pequena, traça, ácaros, mosca-branca, tripes, pulgões e burrinho, além de doenças causadas por vírus e bactérias.¹⁹

No Estado da Paraíba, apesar de possuir condições de cultivo favoráveis e se apresentar promissor na produção de tomates,

foram observadas perdas significativas em todas as áreas produtoras, a maioria por problemas fitossanitários.⁵ Esta perda pode ser decorrente da monocultura intensiva do tomate, gerando problemas fitossanitários decorrentes das viroses, como as tospovirose e geminivirose¹¹. Em pesquisa realizada anteriormente, foi averiguado que a produção de tomate na Paraíba foi de 8.995 toneladas, tendo um total de área plantada de 331 ha e uma área coletada de 287 ha, possuindo assim um rendimento de 31202 Kg/ha³. Estes dados nos mostram que houve uma redução entre o total de área plantada para colhida de 44 ha, podendo essa redução ser ocasionada por fatores abióticos (clima) e bióticos (doenças e insetos).

Doenças provocadas por vírus de tomate possuem um difícil controle e manejo. Sendo assim, os principais vírus que infectam o tomateiro, pela sua importância econômica, são: *Tobamovirus*; *Tospovirus*; *Potyvirus*; *Crinivirus*; *Begomovirus*, que possuem inúmeras espécies relatadas em todo o Brasil¹¹.

GEMINIVIRUS

Vários são os vírus que podem infectar a cultura do tomateiro, entretanto, os *Geminivirus* possuem grande importância econômica, devido às perdas ocasionadas na agricultura²⁰. A interação *Geminivirus*-tomateiro inicia-se geralmente com clareamento acentuado nas nervuras foliares, acentuando-se por inúmeras manchas cloróticas na forma de mosqueado e mosaico, além de um intenso mosaico amarelo. Quando a infecção ocorre precocemente, a planta tem seu crescimento e desenvolvimento paralisado⁸.

Os *Geminivirus* infectam tanto plantas monocotiledôneas quanto plantas dicotiledôneas e, apesar de haver epidemias de geminivirose com mais frequência em cultivos presentes em re-

giões tropicais e subtropicais, este vírus tem surgido em todo o mundo¹¹.

O primeiro relato de *Geminivirus* em tomateiro no Brasil foi feito na década de 70²¹. Seis diferentes vírus transmitidos por mosca-branca (*Bemisia tabaci*) foram identificados, porém sem causar danos de importância econômica²². A partir de 1992, no Estado de São Paulo, constatou-se a presença do biotipo B de *B. tabaci*, provavelmente introduzido pela importação de plantas ornamentais da Europa ou dos EUA²³. O biotipo B apresenta maior grau de adaptação e dispersão, além de gama de hospedeiro muito mais ampla, que inclui solanáceas, como o tomateiro, e diversas espécies de plantas silvestres e/ou daninhas²². Após o relato da presença do biotipo B, sintomas típicos de infecção por begomovírus em tomateiro foram descritos no Distrito Federal²⁴, no Triângulo Mineiro^{25; 26}, no Rio de Janeiro²⁷, em São Paulo²⁸ e na região Nordeste²⁹. Na região Nordeste do Brasil, os estados da Bahia e Pernambuco são as principais regiões produtoras de tomate, onde foram registrados os primeiros diagnósticos do *Begomovirus*³⁰.

A presença do *Begomovirus* em tomateiros no Brasil pode ter sido favorecida pela rápida disseminação do biotipo B de *B. tabaci*. Agindo como vetor, o inseto teria permitido que os vírus que estavam infectando plantas silvestres e daninhas chegassem ao tomateiro e, por meio de recombinação e/ou reagrupamento de componentes do genoma, se adaptassem ao novo hospedeiro em um processo evolutivo rápido, que culminou com o surgimento de novas espécies. Estudos anteriores realizados no México e nos EUA sugerem que esse processo de evolução e adaptação pode ocorrer em períodos relativamente curtos³¹.

Os vírus pertencentes à família *Geminiviridae* são caracterizados pela morfologia de partículas icosaédricas geminadas e genoma composto por DNA de fita simples circular³² com um ou dois componentes genômicos, monopartidos ou bipartidos, res-

pectivamente. Esses componentes genômicos possuem tamanho de 2,5 a 3 Kb, denominados de DNA-A e DNA-B³³. Atualmente a família é formada por nove gêneros: *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus*, *Becurtovirus*, *Eragrovirus*, *Capulavirus*, *Grablovirus* e *Turncurtovirus*³⁴. Os principais critérios para a separação desses gêneros são a organização do genoma, as plantas hospedeiras e o tipo de inseto vetor³⁵.

Por possuírem como genoma o DNA, os *geminivirus*, em alguns casos, incorporam o DNA viral no genoma da planta hospedeira, podendo permanecer por muito tempo inativado, sendo “ativado” por um fator abiótico ou biótico. Em outros casos, podem auxiliar outros vírus que não possuem a capacidade de replicação, causando maiores perdas. Esse tipo de associação faz com que a ocorrência desse vírus seja bastante imprevisível⁹. Desta forma, medidas de controle são realizadas para controlar o agente vetor e a influência do vírus na planta, como, por exemplo, rotação de culturas, retirada e destruição de restos culturais, manejo de ervas invasoras, períodos livres de plantios, barreira viva, cultura-armadilha, estande mais denso, cobertura de solos com plásticos ou com outras substâncias refletivas ou ainda coberturas vivas². Porém, essas medidas não se tornam eficazes para combater o agente vetor (inseto), bem como o agente infeccioso (vírus) nas plantas.

Sendo assim, é notável a importância fitopatogênica da família *Geminiviridae*, pois viroses causadas por espécies dessa família estão sempre surgindo no mundo todo, causando severos danos econômicos em importantes culturas².

BEGOMOVIRUS

Os *Begomovirus* infectam plantas dicotiledôneas, possuem gama de hospedeiros relativamente restritas, e a maioria possui

dois componentes genômicos, com exceção de alguns isolados da espécie TYLCV³⁶, sendo que cada componente genômico tem entre 2,5 e 2,6 kb de tamanho, além de, em alguns casos, possuir DNAs satélites. As funções dos DNAs satélites ainda não estão totalmente elucidadas, dependendo, em grande parte, de quais *Begomovirus* os satélites estão ligados, porém há estudos que apontam uma ligação com o aumento da virulência do patógeno e a supressão do silenciamento gênico da planta¹¹. Entre os *Begomovirus* de maior importância econômica, podem-se citar o BGMV, o ACMV e o TYLCV³⁷.

Na grande maioria dos *Begomovirus*, o componente genômico denominado DNA-A é responsável pela replicação e encapsidamento do genoma viral; enquanto o componente genômico denominado DNA-B contém os genes requeridos para o movimento célula-a-célula e a longa distância, gama de hospedeiros e desenvolvimento de sintomas. Para que ocorra a infecção sistêmica, é necessária a presença de ambos os componentes. Os componentes A e B não possuem homologia de sequência, exceto por uma região intergênica com aproximadamente 200 nucleotídeos, denominada região comum (RC), que é altamente conservada entre os dois componentes de uma determinada espécie viral (acima de 90% de homologia)³⁶. A identificação do vírus é baseada na análise e comparação do genoma do DNA-A dos isolados¹¹.

Atualmente o gênero *Begomovirus* possui 424 espécies descritas³⁴. Essas espécies de *Begomovirus*, geralmente, apresentam uma distribuição geográfica bem definida, em que os vírus com um componente genômico encontram-se no Velho Mundo (países da Europa, África e Ásia) e os vírus com dois componentes genômicos encontram-se no Novo Mundo¹¹.

As espécies de *Begomovirus* relatadas no Brasil não são encontradas em nenhum outro local, sugerindo que estas são nativas, sendo todas bipartidas. Sabe-se que há uma aparente distribuição

diferenciada de espécies dentro do país, sendo o *Tomato Severe Rugose Virus* (TOSRV) encontrado predominante na região centro-sul; e por outro lado, o *Tomato Mottle Leaf Curl Virus* (TMOLCV) parece ser predominante na região Nordeste. Entretanto, é preciso ressaltar que o estudo de diversidade e distribuição dos *Begomovirus* ainda é deficiente para a região Nordeste brasileira¹¹.

Além da diversidade viral e da alta incidência de vírus encontrados em tomateiros, o maior problema encontrado pelos agricultores é o seu controle, já que não é possível eliminá-los sem prejudicar a planta hospedeira¹¹. Assim, como o *Begomovirus* possui grande influência na cadeia produtiva do tomate, progressos consideráveis na identificação e caracterização biológica-molecular do vírus foram realizados, contribuindo assim para o desenvolvimento de materiais resistentes, sendo esta a forma mais eficiente de combater o aumento da incidência e da severidade das infecções por *Begomovirus* em tomateiro no Brasil³⁸.

DIAGNÓSTICO VIRAL

Uma boa medida no controle de doenças causadas por vírus no campo depende do diagnóstico preciso. No diagnóstico de viroses vegetais, são utilizados métodos biológicos, sorológicos e moleculares. Uma premissa básica para auxiliar o diagnóstico de vírus são os estudos de incidência no campo. Entretanto, uma simples observação visual de sintomas de incidência de vírus em plantio de tomateiro no campo não indica a presença desses vírus, uma vez que estes podem ser facilmente confundidos com os causados por desequilíbrios nutricionais, diferenças varietais e infecção por outros vírus.

A diagnose exata de uma doença é um requisito essencial para a recomendação de medidas de controle. O ideal é que um

teste diagnóstico proporcione resultados rápidos e precisos a baixo custo, o que geralmente não acontece na prática, uma vez que a rapidez e a precisão dos testes são inversamente proporcionais ao seu custo. Os testes mais comumente utilizados para a diagnose das fitoviroses podem ser divididos em três grupos: a) biológicos baseados nas propriedades biológicas dos vírus, como morfologia da partícula e gama de hospedeiros; b) sorológicos, com base na detecção da proteína capsidial do vírus; c) testes moleculares, os quais são fundamentados na detecção e/ou análise do ácido nucleico viral³⁹.

Com o desenvolvimento da biologia molecular, várias técnicas foram evidenciadas como ferramenta auxiliar para identificação de fitopatógenos, o que elevou consideravelmente a eficiência e a segurança, principalmente no que diz respeito a sua taxonomia e classificação²⁶. Por meio de estudos moleculares, é possível detectar indivíduos e suas diferenças, que muitas vezes são causadas por alterações de um único par de bases, tendo aplicações imediatas na identificação e caracterização de linhagens e genótipos⁴⁰. Uma vantagem observada na utilização das técnicas moleculares é o grande aumento da sensibilidade em comparação a outros métodos, como o teste de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), no qual a sensibilidade pode ser de cem a mil vezes maior⁴¹.

Os marcadores moleculares podem ser definidos como características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e que são herdados geneticamente, sendo um marcador genético ao ser comprovado que seu comportamento está de acordo com as leis de Mendel da herança⁴².

O método molecular mais utilizado no diagnóstico é a PCR, em que são empregados oligonucleotídeos universais e a hibridação de ácidos nucleicos, utilizando fragmentos clonados do DNA viral⁴³.

O RAPD, AFLP, microssatélites, SCAR e STS são exemplos de técnicas moleculares derivados da aplicação da técnica de PCR.

Outras técnicas que se destacam são RFLP e os minissatélites, que são baseados em hibridização⁴².

No melhoramento genético de plantas, tem-se buscado, cada vez mais, a manipulação assistida por marcadores moleculares, visando obter maior eficiência na transferência de fatores genéticos. Marcadores moleculares ligados a diferentes características de importância econômica têm sido desenvolvidos, permitindo a seleção indireta de características desejáveis em gerações segregantes precoces. Esta estratégia reduziria tempo, fontes e energia necessários não só para desenvolver grandes populações segregantes por várias gerações, mas também para estimar parâmetros usados na seleção indireta. Nesse contexto, marcadores moleculares são ferramentas úteis para detectar variações no genoma, aumentando o poder de análise genética das plantas⁴⁰.

Diante do que foi apresentado anteriormente, foi possível deduzir que um levantamento das áreas produtoras de tomate é necessário, buscando diagnosticar corretamente a etiologia viral de infecção através de métodos moleculares em conjunto com a análise da severidade dos sintomas nelas encontrados, proporcionando uma precisão no diagnóstico e na avaliação de diferentes níveis de influência do *Begomovirus*, auxiliando, assim, futuras pesquisas e objetivando um melhor entendimento da relação da cultura do tomateiro com esse vírus no Estado da Paraíba.

METODOLOGIA

CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO E COLETA DO MATERIAL

Duas áreas produtoras de tomate do tipo italiano (*solanum lycopersicum*) foram selecionadas na região do Cariri Paraibano,

abrangendo os municípios de Serra Branca (07° 29' 00" S e 36° 39' 54" W – Área 1) e Amparo (07° 34' 05" S e 37° 03' 49" W – Área 2). Buscou-se padronizar as áreas escolhidas quanto ao tipo de solo, sendo Brunos Não Cálcico vértico, fase pedregosa, com caatinga hiperxerófila e relevo suave ondulado, associado com solos litólicos eutróficos, com fraca textura arenosa e/ou média fase pedregosa e rochosa. A temperatura média anual nestas áreas é de 24,5°C.

Com as duas áreas definidas, amostras foliares apresentando sintomas virais característicos foram coletadas e armazenadas em sacos do tipo flip-flop. As amostras foram fotodocumentadas para comparação dos sintomas, embaladas, etiquetadas e levadas para o Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande (CDSA/UFCG), onde foram armazenadas a -20°C para posterior análise molecular. Duas folhas sintomáticas por indivíduo foram coletadas, totalizando 83 indivíduos amostrados, sendo, respectivamente, 51 amostras de plantas sintomáticas em Serra Branca e 32 em Amparo.

Os sintomas foram avaliados com base na literatura, observando deformações foliares em tomateiro (*solanum lycopersicum*) provocados por vírus. Os sintomas mais característicos são: (i) clareamento das nervuras foliares; (ii) mosaico amarelo; (iii) deformação foliar; e (iv) rugosidade foliar (enrolamento das bordas para cima) (11). Com base nesses sintomas, o clareamento das nervuras nas folhas em tomateiro é provocado sobretudo por *Begomovirus*, enquanto os outros sintomas podem ser provocados por mais de um tipo de vírus². Dessa forma, as coletas foram padronizadas de acordo com os sintomas relatados pelos autores citados acima e foi tomado nota das folhas que apresentaram clareamento nas nervuras.

Para explorar diferenças nas duas áreas de plantações de tomateiro (Amparo x Serra Branca), com base nos sintomas virais observados, análises multivariadas não paramétricas foram realizadas usando o Primer 6 (v. 6.1.13) com a extensão PERMANOVA+ versão 1.0.3^{44,45}. Uma matriz qualitativa com dados binários (presença/ausência), de indivíduos infectados por área, foi montada e feita uma análise de agrupamento pelo vizinho mais próximo e mais distante, pretendendo realçar em grupos as duas áreas, por meio da análise de similaridade de correspondência simples (*simple Matching*). Para testar o efeito das interações das similaridades entre os locais estudados (fator fixo), uma análise permutacional de variância (PERMANOVA), com 999 permutações aleatórias não restritivas, foi aplicada para testar diferenças entre os sintomas observados nos tomateiros. O teste de Monte-Carlo foi aplicado para validação da PERMANOVA. Verificou-se também a percentagem de contribuição por cada sintoma nos locais estudados, no intuito de analisar quais sintomas estavam mais ocorrentes por plantação e qual o grau da influência do *Begomovirus* nos tomateiros. A contribuição de cada sintoma foi determinada pela percentagem de similaridade (SIMPER), e foram considerados apenas indivíduos infectados⁴⁶.

Uma análise de redundância (RDA) com a matriz de similaridade dos dados binários foi realizada para discriminar quais as variáveis sintomáticas que mais contribuíram na variação dos indivíduos das plantações de tomate coletadas, e que percentagem desta variância é explicada por tais sintomas. Esse teste foi realizado utilizando o Primer 6 (v. 6.1.13) com a extensão PERMANOVA+ versão 1.0.3^{44,45}.

As análises moleculares foram realizadas em parceria com o Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco. Para a diagnose do *Begomovirus*, as amostras coletadas foram submetidas à extração de DNA total utilizando-se os métodos CTAB⁴⁷, com algumas modificações. A metodologia consistiu, inicialmente, na maceração das folhas até a formação de um pó bem fino, incubado em tubos *epENDORF* de 1,5 mL.

Após a maceração das folhas, utilizou-se o método CTAB para a extração de DNA viral, ao qual foi adicionado em cada *epENDORF* 0,5 g de tecido com 800 µL de solução tampão de extração (20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCL pH 8,0; 2 M NaCl; 2% CTAB; 2% PVP; 2% βmercaptoetanol) que foram submetidos a incubação em banho-maria a 65°C durante 1 hora. Para a separação do DNA viral, utilizou-se extração por precipitação com a adição de 600 µL de CIA (clorofórmio: álcool isoamílico 24:1) e agitado vigorosamente por 5 min com Vortex. Em seguida, os tubos foram submetidos à centrifugação com centrífuga CK-12 Kitlab, por 10 min, a 14000 rpm; com o fim deste processo, o sobrenadante foi transferido para um novo *epENDORF* e foram adicionados 500 µL de CIA e novamente centrifugados. O sobrenadante foi transferido para um novo *epENDORF* e foram adicionados 500 µL isopropanol. Os tubos foram agitados manualmente por inversão, resfriados a -20°C, pernoitados e centrifugados a 9000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com 800 µL de etanol 70%. Nova centrifugação foi realizada por 4 min a 9000 rpm com o sobrenadante descartado e adicionado 790 µL de álcool absoluto. O preparado foi centrifugado por 4 min a 9000 rpm; e

o precipitado seco, a temperatura ambiente (25°C), por aproximadamente 50 min. O DNA foi ressuscitado em tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA), tratado com RNase (10 mg/mL) a 37°C por 30 min e armazenado a -20°C até o momento do uso do preparado para realizar a PCR (reação de cadeia de polimerase). A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose 0,8%.

DIAGNÓSTICO DO DNA VIRAL VIA PCR ESPECÍFICO

Após a extração do DNA, a identificação viral foi realizada com reação de PCR específica utilizando oligonucleotídeos PALVI1978 (5'GCATCTGCAGGCCCACTYGTCTTYCCNGT3') e PARIC496 (5'AATAC-TGCAGGGCTTYCTRTACATRGG3') que amplificam o fragmento de aproximadamente 1,2 Kb do DNA-A do *Begomovirus*⁴³. As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 25 µL contendo 2.5 µL de tampão 10X da enzima Taq DNA Polimerase (100 mM Tris-HCl, pH 8,3 e 500 mM KCl (Invitrogen,)), 1.0 µL de MgCl₂ (50 mM, Invitrogen), 0.5 µL dNTPs (2,5 mM, Invitrogen), 1.0 µL de cada primer PALVI1978/PARC715 (10uM), 0.3 µL da enzima Taq DNA Polimerase (5U/µL, Invitrogen), água MiliQ e 100ng de DNA. As amostras foram submetidas à amplificação em termociclador Master Cycler, nas condições de desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 25 ciclos (95°C por 30s; 48°C por 40s e 72°C por 1 min) e extensão final a 72°C durante 3 min. A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose 0,8%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com os dados da matriz binária (presença/ausência) e os resultados de similaridade *Simple Matching* utilizando o fator fixo

(Amparo x Serra Branca), a análise de permutação multivariada (PERMANOVA) mostrou diferenças significativas ($p = 0,001$) entre os locais, havendo assim divergências na severidade dos sintomas virais por cada plantação de *Solanum lycopersicum*. Os resultados da PERMANOVA se encontram na Tabela 1.

Observa-se também que o número de permutações foi inferior ao esperado (999), sendo realizadas 550 permutações, indicando resultados aceitáveis, porém não ideais.

TABELA 1 - ANÁLISE DE PERMUTAÇÃO MULTIVARIADA (PERMANOVA) ENTRE OS LOCAIS TRABALHADOS (AMPARO X SERRA BRANCA). ONDE: GL = GRAUS DE LIBERDADE; DP = DESVIO PADRÃO; MP = MÉDIA PADRÃO; P(MC) = TESTE DE SIGNIFICÂNCIA DE MONTE-CARLO.

Fonte de Variação	gl	DP	MP	Pseudo-F	P(perm)	Permutações	p(MC)
Locais	1	7911,4	7911,4	41,101	*0,001	550	*0,001
Resíduos	71	13667	192,49				
Total	72	21578					

De acordo com a análise de percentagem de similaridade (SIMPER), a qual calcula a contribuição percentual de cada sintoma ocorrido nas plantações, a Tabela 2a mostra que os sintomas com maior contribuição foram rugosidade e deformação foliar, com contribuição de 31,94% e 59,03%, respectivamente. Outro sintoma observado foi o clareamento das nervuras, com 9,03%, indicando a influência do *Begomovirus* nos indivíduos na plantação de tomate, em Amparo, de maneira mais forte. Na Tabela 2b, para os indivíduos de *Solanum lycopersicum* avaliados em Serra Branca, os sintomas mais frequentes foram rugosidade, manchas amareladas e deformação foliar, com 75,11%, 18,45% e 6,44%, respectivamente. Percebeu-se que não houve uma influência maior do *Begomovirus* na plantação de Serra Branca quando comparada com a plantação de Amparo, o que pode indicar a presença de

outros patógenos que causam sintomas semelhantes encontrados no presente estudo. A exemplo, a grande frequência do sintoma rugosidade pode ser característica dos vírus dos gêneros *Tobamovirus* e *Cucumovirus*⁴⁸, e dos vírus ToYTV (*Tomato yellow top virus*) e TBYLV (*Tomato bottom yellow leaf virus*) da família *Luteoviridae*¹⁹.

TABELA 2A - PERCENTAGEM DE SIMILARIDADE (SIMPER) DOS SINTOMAS VIRAIS PARA PLANTAÇÃO DE AMPARO

Sintomas	Amparo	
	Contribuição (%)	Contribuição Cumulativa (%)
Manchas Amareladas	0	0
Clareamento	9,03	9,03
Rugosidade	31,94	40,97
Deformação	59,03	100

TABELA 2B - PERCENTAGEM DE SIMILARIDADE (SIMPER) DOS SINTOMAS VIRAIS PARA A PLANTAÇÃO DE SERRA BRANCA

Sintomas	Serra Branca	
	Contribuição (%)	Contribuição Cumulativa (%)
Clareamento	0	0
Deformação	6,44	6,44
Manchas Amareladas	18,45	24,89
Rugosidade	75,11	100

A análise de redundância (dbrDA) mostrou uma variação total de 71,5% explicada para o eixo 1 e de 50,1% para o eixo 2 (Fig. 1), enquanto a variação individual no eixo 1 foi de 59,28% e no eixo

2 de 41,56% (Tabela 3). Os sintomas que contribuíram com maior representatividade da variância nos eixos foram clareamento das nervuras, deformação foliar e rugosidade (Tabela 4). Assim, tem-se a demonstração de que as duas áreas apresentaram frequência de sintomas diferentes, variando de acordo com a severidade. No município de Amparo, observamos maior influência do *Begomovirus* nas plantações de tomate quando comparado com Serra Branca.

FIGURA 1 - ORDENAÇÃO DOS EIXOS DA ANÁLISE DE REDUNDÂNCIA EXPLICANDO A INFLUÊNCIA DOS SINTOMAS ENTRE OS LOCAIS ESTUDADOS

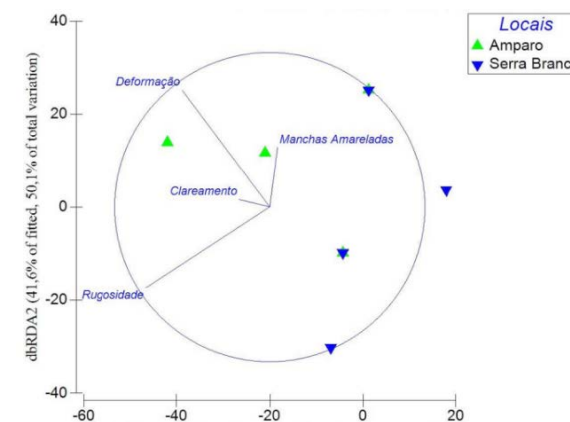


TABELA 3 - PORCENTAGEM DE VARIAÇÃO EXPLICADA PARA OS EIXOS DA ANÁLISE DE REDUNDÂNCIA (dbrDA) DOS SINTOMAS VIRAIS ENTRE OS LOCAIS

Eixos	dbrDA			
	Variação por Eixo (%)		Variação Total (%)	
	Individual	Cumulativa	Individual	Cumulativa
1	59,28	59,28	71,46	71,46
2	41,56	100,84	50,11	121,57
3	2,03	102,87	2,45	124,02
4	-2,87	100	-3,46	120,56

TABELA 4 - CORRELAÇÃO PARCIAL MÚLTIPLA DA ANÁLISE DE REDUNDÂNCIA (DBRDA) ENTRE AS COORDENADAS DAS VARIÁVEIS MEDIDAS (SINTOMAS VIRAIS) E OS LOCAIS ESTUDADOS (AMPARO X SERRA BRANCA)

dbRDA (correlação parcial múltipla)				
Variáveis	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3	dbRDA4
Clareamento das Nervuras	-0,198	0,047	-0,681	0,703
Manchas Amareladas	0,051	0,387	-0,655	-0,647
Deformação Foliar	-0,566	0,758	0,312	0,092
Rugosidade	-0,799	-0,524	-0,094	-0,281

Como mostrado na Tabela 1, a qual contém o resultado da PERMANOVA, houve uma diferença significativa na severidade dos sintomas entre as áreas estudadas. Esta diferença pode ser proveniente de diversos fatores. Por exemplo, a frequência e a intensidade de doenças no tomateiro podem ser influenciadas por distintas causas, como: a forma de implantação e condução da lavoura; a qualidade da semente, a localização da área plantada e o estado nutricional da planta³⁵. Outro aspecto a ser observado é o fato de que, na plantação de Amparo, a cultura de tomateiro era feita em conjunto com cultura de pimentão, o que não acontecia em Serra Branca, sendo isso um fator a ser considerado. De acordo com a literatura, espécies de *Begomovirus* também infectam outras culturas economicamente importantes, como o pimentão, o que possibilitaria a manutenção do vírus nas épocas em que o tomateiro não está presente no campo, servindo de reservatório de inóculo para o próximo plantio⁴⁹.

Deve-se ponderar também o fator climático, tendo em vista que as plantações foram analisadas em diferentes épocas do ano: a coleta de Serra Branca foi feita no mês de janeiro de 2017; e a co-

leta de Amparo, em julho de 2017, podendo assim ter influenciado na severidade dos sintomas. Um estudo anterior também realizou seus experimentos com análise de sintomas de TOYVSV, uma espécie de *Begomovirus*, e averiguou que, apesar de as coletas terem sido realizadas no mesmo local, porém em épocas diferentes, foi observado um aumento da influência viral junto às variações ambientais, interferindo nos sintomas avaliados². Outra pesquisa apontou que uma mesma espécie de vírus pode causar respostas diferentes em um mesmo hospedeiro se estiver em ambientes distintos⁹, corroborando, assim, os resultados apresentados neste trabalho. Neste mesmo experimento, elucidou-se que as diferenças de sintomas podem ser expressas, em determinadas situações, devido ao estresse abiótico e à interação com outros patógenos. Desta forma, pode-se supor a possibilidade de ter havido outros patógenos presentes nas amostras coletadas, resultando nas diferenças de frequência dos sintomas nas áreas apresentadas nas Tabelas 2a e Tabela 2b.

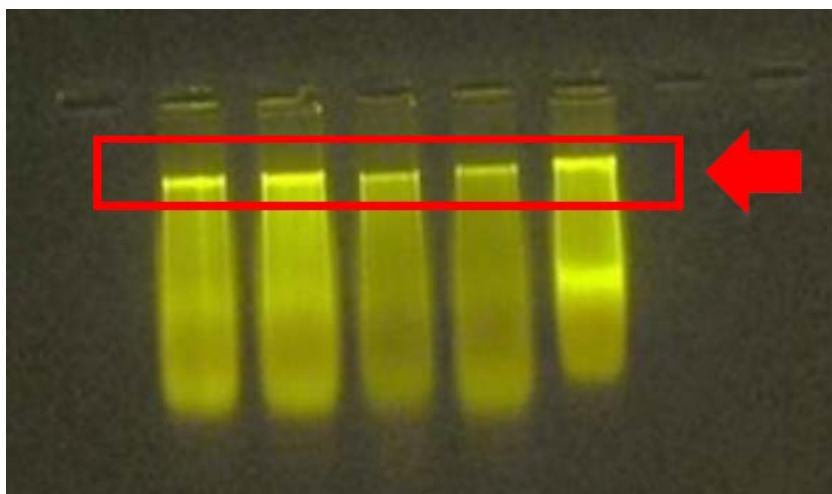
Alguns autores citam que espécies de *tosspovirus* podem causar deformação foliar; já as espécies de *tobamovirus* e *cucumovirus* apresentam, como um dos sintomas, o enrolamento foliar (rugosidade); os sintomas característicos de *crinivirus* são as manchas cloróticas/amareladas⁴⁸, e que os vírus TOYTV e TBYLV da família *Luteoviridea* são causadores do sintoma enrolamento foliar (rugosidade)¹⁹. Outro autor cita a família *Potyviridae* como causadora dos sintomas deformação foliar e manchas cloróticas/amareladas³⁵.

Mesmo o *Begomovirus* estando presente na plantação de Serra Branca, os sintomas apresentados nesta área foram brandos, sendo necessária a realização de novos estudos que possam elucidar a diversidade viral presente e a influência da interação desses patógenos na sintomatologia.

ANÁLISE MOLECULAR

Até a conclusão deste trabalho, só foram realizadas as análises moleculares das amostras coletadas na área de Serra Branca. Através do método CTAB, foi possível realizar a extração de DNA das amostras coletadas na Área 1 e, posteriormente, sua quantificação (Fig. 2).

FIGURA 2 - QUANTIFICAÇÃO DE DNA PROVENIENTE DE TOMATEIRO EM GEL DE AGAROSE

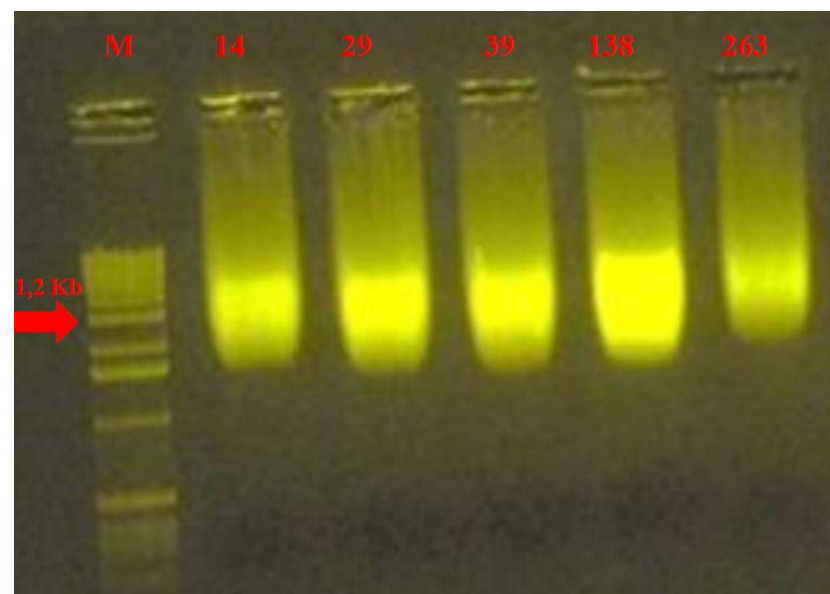


Fonte: Arquivo da pesquisa.

É notável, na Fig. 4, que o DNA apresentou um padrão de arraste no gel, o que demonstra a sua degradação. Esta pode ser proveniente de diversos fatores, como o tempo de armazenamento das amostras ou possíveis contaminantes. Entretanto, é possível visualizar bandas, evidenciando a extração do DNA viral.

Logo após, foi realizada a reação PCR específica utilizando os marcadores moleculares PALIV1978 e PARIC496, ocorrendo a quantificação posteriormente à amplificação (Fig. 3).

FIGURA 3 - AMPLIFICAÇÃO DE DNA VIA PCR QUANTIFICADO EM GEL DE AGAROSE



Fonte: Arquivo da pesquisa.

É possível visualizar, na Fig. 3, que há um arraste no gel comprometendo o resultado da amplificação, sendo proveniente da degradação do DNA anteriormente mencionado. Entretanto, ainda é aparente a presença de bandas amplificadas no tamanho aproximado de 1,2 Kb, corroborando o diagnóstico do DNA viral para *Begomovirus*.

Esta análise se faz necessária, já que a presença ou a ausência de sintomas, e seus diferentes níveis de severidade, não são suficientes para afirmar a infecção do tomateiro por *Begomovirus*, apesar de ser um forte sinalizador. O resultado deste estudo mostra a eficiência da análise molecular para identificação viral. Estudos realizados anteriormente mostram que testes sorológicos não são tão conclusivos na identificação de vírus, já que diversas identificações podem apresentar um resultado falso-positivo⁵⁰.

Outro estudo também realizou o diagnóstico molecular para detecção de *Begomovirus* presente em amostras de tomateiro e conclui que a sintomatologia visual não é parâmetro suficiente para identificação de fitopatógenos, sendo assim necessária a utilização de técnicas moleculares, já que permite com eficiência e rapidez a detecção e o estudo de variabilidade genética de vírus⁵¹.

CONCLUSÕES

Através das análises realizadas no presente estudo, concluiu-se que os sintomas avaliados nas plantações de tomate em Amparo e Serra Branca não são exclusivos para o *Begomovirus*, apenas o clareamento de nervura ocorrido em Amparo, o que caracterizou a baixa frequência sintomática do vírus diagnosticado nas duas plantações. Considerando as diferenças das estações de coleta, quanto a período do ano, formas do cultivo e diferenças climáticas, por exemplo, fatores que podem ter contribuído nos resultados apresentados, faz-se necessária uma nova avaliação nas plantações de tomateiro na região do Cariri paraibano, principalmente com a realização de uma diagnose viral mais conclusiva para o vírus estudado e para outros não diagnosticados aqui. Objetiva-se assim uma investigação mais precisa quanto à influência do *Begomovirus* nas plantações estudadas, o que corrobora a análise molecular realizada com os marcadores PALIV1978 e PALIV1978, que se apresentou conclusiva para o diagnóstico de *Begomovirus* na plantação de Serra Branca.

Dessa forma, este trabalho traz informações pertinentes sobre a identificação e influência dos vírus nas plantações de tomate na região do Cariri paraibano. Apesar do seu viés amostral, é assim uma primeira evidência da influência viral nestas planta-

ções, o que pode contribuir para a baixa produtividade, afetando a economia da região.

REFERÊNCIAS

1. Alencar FC, Pais AKL, Nascimento MKB, Lima HA, Paz CD, Peixoto AR. Avaliação *in vitro* do antagonismo de BPCPs ao *Fusarium f. sp. lycopersici*. Horticultura Brasileira. 2012 Jul; 30 (2): 185-91.
2. Santos FFB. Obtenção e Seleção de Híbridos de Tomate Visando à Resistência ao *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) [Dissertação]. [Campinas (SP)]: Instituto Agrônômico; 2009. 75p.
3. IBGE. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola Estatística da Produção Agrícola. Indicadores IBGE [Internet]. 2020 Fev [Acesso em 7 Jun 2020]; [90 p.]. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2415/epag_2020_fev.pdf
4. Fári M, Resende GM, Melo NF. Avaliação da capacidade de regeneração *in vitro* em tomateiro industrial. Pesq. agropec. Bras. 2000 Ago; 35 (8): 1523-29.
5. Togni PHB. Bases Ecológicas para o Manejo de *Bemisia tabaci* (Genn.) Biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) em Sistemas Orgânicos de Produção de Tomate [Dissertação]. [Brasília (DF)]: Universidade de Brasília; 2009. 110p.

6. Hull R. *Matthew's Plant Virology*. Londres: Academic Press; 2002. 1001p.
7. Polston JE, Barro P, Boykin LM. Transmission specificities of plant viruses with the newly identified species of the *Bemisia tabaci* species complex. *Pest Manag Sci* [Internet]. 2014 Jan [Acesso em 01 Mar 2018]; 70: [5p.]. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/ps.3738>>.
8. Villas-Bôas GLV, Branco MC. Manejo Integrado da Mosca-Branca (*Bemisia tabaci* biótipo B) em Sistema de Produção Integrada de Tomate Indústria (PITI). Brasília: Embrapa; 2009. 16p.
9. Rocha GA. Begomovírus em áreas de cerrado: de herbáceas cultivadas a arbóreas selvagens [Dissertação]. [Goiânia (GO)]: Universidade Federal de Goiás; 2017. 70p.
10. Quezado-Duval AM, Nascimento AR, Pontes NC, et al. Desempenho de híbridos de tomate para processamento industrial em pressão de begomovirose e de mancha-bacteriana. *Horticultura Brasileira*. 2014; 32: 446-52.
11. Souza JO. Análise da Diversidade de Begomovírus em Tomateiros (*Solanum lycopersicum*) da Região Nordeste do Brasil [Dissertação]. [Brasília (DF)]: Universidade de Brasília; 2014. 101p.
12. Mullis KB, Faloona FA. Synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology*. 1987; 15: 335-50.
13. Santos JCS. Seleção de linhagens avançadas de tomateiro resistentes ao geminivírus (*Tomato yellow vein streak virus – ToYVSV*) [Dissertação]. [Campinas (SP)]: Instituto Agrônômico; 2010. 80p.
14. Boiteux LS, Fonseca MEN, Viera JV, Pereira-Carvalho RC. Melhoramento para resistência a doenças virais. p. 89–119. In: BORÉM A, FRITSCH-NETO R. (eds.) *Melhoramento de Plantas para Condições de Estresses Bióticos*. Visconde de Rio Branco: Suprema; 2012. 240p.
15. Makishima N. O popular tomate. In: Programa Brasileiro Para Modernização Da Horticultura. Normas de classificação do tomate. São Paulo: Centro de Qualidade em Horticultura/CEAGESP; 2003. (CQH. Documentos, 26).
16. Rick CM. El tomate. *Investigacion y Ciência*. 1978; 25: 45-55.
17. *AGRIANUAL: anuário da agricultura brasileira*. São Paulo: FNP Consultoria & Comercio; 2017. 472 p.
18. Barone A, Di Matteo A, Carputo D, Frusciante L. High-throughput genomics enhances tomato breeding efficiency. 2009; 10 (1): 1-9.
19. Kurozawa C, Pavan MA. Doenças do tomateiro. p. 607-626. In: *Manual de fitopatologia: Doenças de Plantas cultivadas*. São Paulo: Agronômica Ceres; 2005. 774p.
20. Briddon RW. Cotton leaf curl disease, a multicomponent Begomovirus. *Molecular plant Pathology*. 2003; 4: 427-34.

21. Costa AS, Oliveira AR, Silva DM. Transmissão mecânica do mosaico dourado do tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*. 1975; 6: 147.
22. Bedford ID, Briddon RW, Brown JK, Rosell RC, Markham PG. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographical regions. *Annals of Applied Biology*. 1994; 125: 311-25.
23. Melo PCT. Mosca branca ameaça produção de hortaliças. Campinas: Asgrow do Brasil Sementes Ltda. Technical Bulletin. 1992.
24. França FH, Villas-Boas GL, Castelo-Branco, M. Ocorrência de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera: Aleyrodidae) no Distrito Federal. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*. 1996; 25: 369-72.
25. Rezende EA, Filgueira FAR, Zerbini FM, et al. Tomato infected with geminivirus in greenhouse conditions at Uberlândia-MG, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*. 1996; 21: 424.
26. Zerbini FM, Zambolim EM, Carrijo IV, Gilbertson RL. A new bipartite geminivirus infecting tomatoes in Minas Gerais, Brazil. *Phytopathology*, 1996; 86: S1.
27. Galvão RM, Fernandes AV, Almeida JD, Alfenas PF, Andrade EC, Fontes EPB. Molecular characterization of two new tomato-infecting geminiviruses and the Sida-infecting geminiviruses complex from Brazil. International Workshop on *Bemisia* and Geminiviral diseases; 1998; San Juan, Puerto Rico. p. L-93.
28. Faria JC, Souza-Dias JAC, Slack S, Maxwell DP. A new geminivirus associated with tomato in the State of São Paulo, Brazil. *Plant Disease*. 1997; 81: 423.
29. Ribeiro SG, Bezerra IC, Lima MF, Ávila AC, Giordano LB. Occurrence of geminivirus in tomato plants in Bahia. VIII Encontro Nacional de Virologia; 1996; São Lourenço, MG: SBV. p. 290.
30. Bezerra IC, Lima MF, Ribeiro SG, Giordano LB, Zerbini FM, Ávila AC. Occurrence of geminivirus in tomato-producing areas in Submédio São Francisco. *Fitopatologia Brasileira*. 1997; 22: 331.
31. Hou YM, Gilbertson RL. Increased pathogenicity in a pseudorecombinant bipartite geminivirus correlates with intermolecular recombination. *Journal of Virology*. 1996; 70: 5430-36.
32. Stanley J, Bisaro DM, Briddon RW, et al. Family Geminiviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, et al. (Eds.). *Virus Taxonomy*. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005. p. 301-26.
33. Medeiros RB, Resende RO, Carvalho RCP, et al. *Virologia vegetal*. Brasília: Universidade de Brasília; 2015. 765p.

34. ICTV. Virus taxonomy: 2019 release. 2019 Jul. [Acesso em 08 Jun 2020]; Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>.
35. Rêgo CM. Diversidade genômica de begomovírus em tomateiros resistente (brs sena) e susceptível (h-9553) [Dissertação]. [Brasília (DF)]: Universidade de Brasília; 2016. 101p.
36. Fernandes JJ. Caracterização e diversidade genética de geminivírus associados ao tomateiro na região do triângulo mineiro [Tese]. [Viçosa (MG)]: Universidade Federal de Viçosa; 2001. 163p.
37. Potter JL, Nakha MK, Mejia L, Maxwell DP. PCR and DNA hybridization methods for specific detection of bean-infecting begomoviruses in the Americas and Caribbean. *Plant Disease*. 2003; 87: 1205-12.
38. Hurtado FD, Gil MA, Zubiaur YM, et al. Fontes de resistência em tomateiro aos begomovírus bissegmentados Tomato yellow spot virus e Tomato severe rugose virus. *Horticultura Brasileira*. 2012; 30: 639-44.
39. Lima MF. Detecção e Controle de Viroses em Videira. Petrolina: Embrapa Semiárido; 2009. 9 p.
40. Borém A, Caixeta TE. Marcadores moleculares. Viçosa: UFV, 2006. 374p.
41. Silvano PES. Diagnose das viroses do enrolamento das folhas associado-3 e do intumescimento dos ramos da videira (vittis spp) em Santa Catarina [Dissertação]. [Florianópolis (SC)]: Universidade Federal de Santa Catarina; 2003. 82p.
42. Silva EKC. Cowpea severe mosaic virus: Diagnóstico, estudo de herança e identificação de marcadores moleculares associados a resistência [Dissertação]. [Recife (PE)]: Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2008. 72p.
43. Rojas MR, Gilbertson RL, Russell DR, Maxwell DP. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease*. 1993; 77: 340-47.
44. Clarke KR, Gorley RN. PRIMER V6: User Manual/ Tutorial. PRIMER-E, Plymouth, UK. 2006.
45. Anderson MJ, Gorley RN, Clarke KR. PERMANOVA+ for PRIMER: Guide to software and Statistical Methods. Institute of Information and Mathematical Sciences. Massey University. 2008.
46. Clarke KR. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Aust. J. Ecol.* 1993; 18: 117-43.
47. Doyle J.J, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochem Bull.* 1987; 19: 11-15.
48. Pereira-Carvalho RC, Lorena M, Dianese CE, Fonseca MEN, Boiteux LS. Melhoramento genético do tomateiro para resistência a doenças de etiologia viral. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. 2014; 22: 280-361.

49. Calegario RF. Caracterização de um isolado de begomovirus sida micranta mosaic virus (SimMV) [Tese]. [Viçosa (MG)]: Universidade Federal de Viçosa; 2004. 50p.
50. Arnaud LSEP, Santos CDG, Lima JAA, Feitosa FAA. Predominância de begomovírus em tomateiros na região produtora da Ibiapaba, Ceará, e sua detecção natural em plantas daninhas. *Fitopatologia Brasileira*. 2007; 32: 241-46.
51. Araujo ALR. Desempenho agrônômico de genótipos de tomateiro e reação a Geminivirus [Dissertação]. [Recife (PE)]: Universidade Federal Rural do Pernambuco; 2014. 58p.

INIBIÇÃO DA ENZIMA NS₅ RdRp *IN SILICO* EVIDENCIA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIVIRAL DA QUECERTINA E DO LINALOL CONTRA O VÍRUS DA ZIKA

Henriqueta Monalisa Farias

Universidade Federal de Campina Grande
Sumé – Paraíba – henriquetamonalisa@gmail.com

Rafael de Lima Medeiros

Universidade Federal de Campina Grande
Cuité – Paraíba – rafaelfufcg@gmail.com

Franklin Ferreira de Farias Nóbrega

Universidade Federal de Campina Grande
Sumé – Paraíba – franklinnobrega@yahoo.com.br

Nilton Ferreira Frazão

Universidade Federal de Campina Grande
Cuité – Paraíba – niltonfrazão@gmail.com

Rafael Trindade Maia

Universidade Federal de Campina Grande
Sumé – Paraíba – rafael.rafatrin@gmail.com

INTRODUÇÃO

Doenças relacionadas com vetores transmissores de epidemias se categorizam como uma preocupação mundial e são responsáveis por um alto número de mortalidade e mobilidade humana. O agravante disso é antecedido por alguns fatores, como: ciclo de vida do mosquito, condições ambientais e sanitárias onde estes se desenvolvem, e hospedeiros e/ou reservatórios que são diretamente responsáveis por encabeçar a cadeia de transmissão das doenças¹. Focando no Brasil, infelizmente o país ainda vive

uma época de carência em termos de saneamento básico, pois mesmo dez anos após a inserção da Lei de Saneamento Básico (Lei nº 11.445/2007), tem-se 48% da população brasileira sem acesso a coleta de esgoto e 57,3% sem esgoto tratado², um número considerável e agravante em termos de proliferação de doenças virais.

O zika vírus (ZIKV) é um arbovírus transmitido pela picada dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, e recentes evidências apontam também o mosquito *Culex quinquesfasciatus* como vetor. Também pode ser transmitida por relações sexuais e transfusão sanguínea, mesmo com parceiros e doadores assintomáticos. Os meios de transmissão salivar, urina e leite materno ainda não foram confirmados. O primeiro registro desta doença foi em 1947, na Floresta Zika, em Uganda, detectado inicialmente em macacos. Em 1954, na Nigéria, foram registrados os primeiros casos humanos³.

A confirmação de transmissão da febre causada pelo zika vírus surgiu no Brasil em meados de abril de 2015, apresentando-se inicialmente nos estados do Rio Grande do Norte e da Bahia, na região Nordeste do país. A Semana Epidemiológica (SE) alertou, no mesmo ano, sobre a sinalização de 19 unidades da Federação sobre a confirmação laboratorialmente da doença, porém não foram divulgados dados quantitativos. Já em 2016, a SE divulgou não só as unidades (13) como também os dados quantitativos, que se mostraram alarmantes: 35.505 casos da doença na região Sudeste, seguida pelo Nordeste, com 30.286 casos; e, no geral, foram 91.387 casos de zika no Brasil¹.

A epidemia causada pelo ZKV começa a se propagar entre 3 e 12 dias após a picada e tem como sintoma marcante a febre baixa (entre 37,8° e 38,5°C), que vem acompanhada de sintomas gerais, dores articulares, conjuntivite, erupções cutâneas com coceiras, dor muscular e dor de cabeça. Apesar de os sintomas parecerem ser triviais, surgiram casos mais severos no Brasil e na Polinésia

Francesa ligados à microcefalia, e uma doença neurológica congênita (síndrome de Guillain-Barré) tem sido catalogada. Dentro desse contexto, com o aumento exponencial de casos, surgiu a preocupação dos órgãos públicos em respeito à saúde mundial, além da imprescindibilidade em vigiar síndromes neurológicas em pacientes febris agudos, também existe a necessidade de mais estudos relacionados ao vírus da zika e pesquisas voltadas a cessar o culminio de seu efeito sobre a população³.

Até o momento não existe vacina disponível para o ZIKV e o tratamento é sintomático, ou seja, não há tratamento específico para a doença, apenas medicamentos para amenizar os sintomas. No entanto, diversos estudos focam em desenvolver vacinas e medicamentos específicos. Em uma recente pesquisa, foi elucidada a estrutura tridimensional da ZIKV NS5 RdRp, uma proteína associada ao RNA polimerase e a importantes ativadores do processo de replicação⁴.

A estrutura tridimensional de uma proteína alvo, preferivelmente com um ligante para a possível elucidação do seu sítio receptor, é o segredo para o desenho de fármacos com base na estrutura; uma vez definida a estrutura do sítio receptor, pode ser utilizada para determinar um farmacóforo para a triagem virtual em bibliotecas de compostos e em pesquisas de *docking* molecular, que podem ser usados para aclarar e aperfeiçoar a estrutura dos compostos líderes⁵.

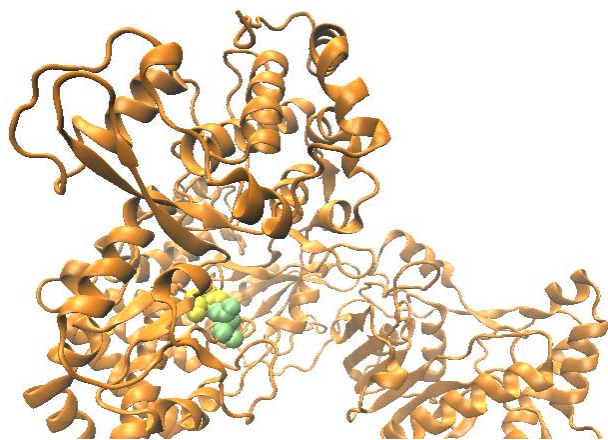
Com a elucidação da estrutura da ZIKV NS5 RdRp, proteína associada à replicação viral, surgem possibilidades de tornar esta enzima um alvo de novos fármacos, tentando a busca de inibidores e experimentos *in silico*, como o *docking* molecular (atracamento), os quais podem ser extremamente úteis para a sinalização de possíveis moléculas com potencial para inibição da proteína NS5. Logo, este artigo teve como objetivo selecionar *in silico* possíveis inibidores da proteína de replicação NS5.

METODOLOGIA

ESTRUTURA DO ZIKV NS5 RDRP

As coordenadas atômicas da ZIKV NS5 RdRp foram obtidas no banco de dados *PDB-Protein Data Bank* através do código de acesso 5UoB⁴. Vale salientar que o artigo que disponibilizou a estrutura apontava os aminoácidos ASP535 e ASP665 como âncoras, ou seja, essenciais para a ativação funcional da proteína. A estrutura foi analisada visualmente pelo software *Discovery Studio*⁶.

FIGURA 1—VISUALIZAÇÃO DO ZIKV NS5 RDRP, EM DESTAQUE OS AMINOÁCIDOS ÂNCORAS 665 (AMARELO) E O 535 (VERDE)

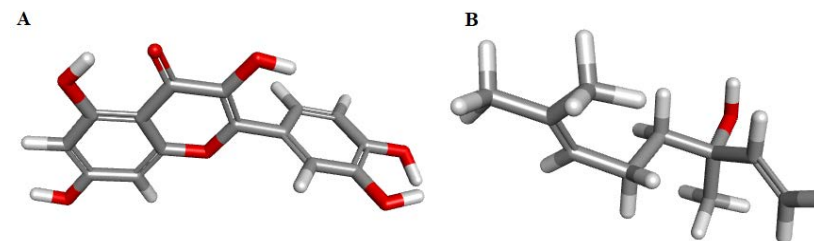


Fonte: Autoria própria.

ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DOS LIGANTES

As estruturas tridimensionais da quercetina e do linalol, mostradas na Fig. 2 a seguir, foram obtidas no banco de dados *Chemspider*⁷ através dos respectivos códigos de identificação, “8280343” e “6549” no formato de arquivo *mol2*.

FIGURA 2—A) ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA QUERCETINA E B) ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO LINALOL. EM DESTAQUE OS AMINOÁCIDOS ÂNCORAS 665



Fonte: *Chemspider*.

DOCKING MOLECULAR

Os experimentos de *docking* proteína-ligante ZIKV NS5 RdRp + Ligante foram realizados no programa *Autodock1.5.6*⁸, no qual ocorreu um pré-dimensionamento da grade cúbica de energia de volume 126 x 126 x 126 Å, que foi centrada no receptor. Utilizou-se o algoritmo genético Lamarckiano (LGA). No programa *Autodock4*, a proteína foi previamente considerada rígida em todas as simulações de *docking*, enquanto os ligantes flexíveis, ao fim, foram obtidos dez conformações de cada interação proteína-ligante testada neste trabalho. Destacaram-se quatro parâmetros que foram considerados mais importantes para a busca do objetivo proposto, estes foram: a interação direta com o sítio ativo da proteína composto pelos aminoácidos Asp535 e Asp665; a constante de dissociação (K_i); a energia intermolecular final e a energia livre de ligação (kcal/mol) estimada pelo programa.

DETERMINAÇÃO ENERGÉTICA DOS COMPLEXOS PROTEÍNA-LIGANTE OBTIDA ATRAVÉS DO MFCC

Os cálculos de energia entre os ligantes e os aminoácidos da proteína NS5 RdRp foram realizados através da técnica do MFCC,

a qual possibilita os cálculos que envolvem proteínas, macromoléculas biológicas e DNA, tendo como foco o fornecimento de informações exatas sobre a energia de interação entre os complexos⁹⁻¹⁰⁻¹¹.

Para realização dos cálculos de energia de interação, utilizou-se o software computacional *Materials Studio*, empregando o código Dmol3, bem como o funcional de troca e correlação: Aproximação do Gradiente Generalizado (GGA), calculadas através do método de fracionamento molecular com capas conjugadas (MFCC).

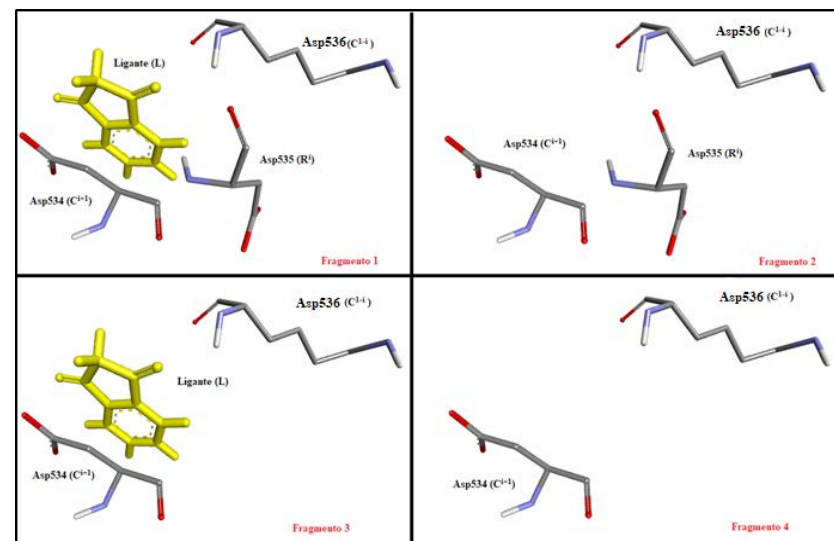
Para verificar a distância entre os resíduos de interação do receptor (como o ligante utilizou o software *Discovery studio*, através dos monitores Centroid, que marca o centro geométrico dos átomos selecionados (BIOVIA, 2016), o raio de corte atribuído ao software foi R=12Å, possibilitando levar em conta todos os resíduos de potencial interação. A otimização das estruturas foi realizada através do mesmo software, com adição de hidrogênios por meio da opção *chemistry-hydrogens-add*. Isto foi necessário para fechar todas as camadas de valência nas estruturas obtidas, inicialmente por difração de raio X ou ressonância nuclear, o que ocorre geralmente por causa da falta de resolução da imagem, que seria necessário 1,2 Å¹¹.

Determinou-se a molécula do ligante como L e o resíduo de aminoácidos que interage com o ligante como Rⁱ. O cap Cⁱ⁻¹ (Cⁱ⁺¹) é formado a partir dos resíduos vizinhos do resíduo Rⁱ ao longo da cadeia de proteína. Empregou-se a linha de investigação em que os dois fragmentos de aminoácidos mais próximos de cada lado do resíduo Rⁱ foram usados para construir o cap Cⁱ⁻¹ e Cⁱ⁺¹, proporcionando uma melhor exposição do ambiente eletrônico. Para estas estruturas fragmentadas, a energia de interação entre o ligante e os fragmentos individuais é calculado de acordo com a seguinte equação¹⁰:

$$EI(L - R^i) = E(L + C^{i-1} R^i C^{i+1}) - E(C^{i-1} R^i C^{i+1}) - E(L + C^{i-1} C^{i+1}) + E(C^{i-1} C^{i+1}) \text{ Eq. (1)}$$

Onde EI (L - Rⁱ) representa a energia quântica total do sistema, que será igual a E (L + Cⁱ⁻¹ Rⁱ Cⁱ⁺¹) energia do ligante mais o resíduo Rⁱ junto a seus Caps conjugados (Fragmento 1 da Fig. 3), menos E (Cⁱ⁻¹ Rⁱ Cⁱ⁺¹), que equivale ao Rⁱ mais os aminoácidos Caps (Fragmento 2 da Fig. 3), menos E (L + Cⁱ⁻¹ Cⁱ⁺¹), que será o ligante mais os Caps conjugados (Fragmento 3 da Fig. 10) e, por fim, somam-se a E (Cⁱ⁻¹ Cⁱ⁺¹) apenas os aminoácidos conjugados Caps (Fragmento 4 da Fig. 3). O cálculo de energia de interação EI (L - RI) expressa-se em kcal/mol, e a Fig. 3 traz de forma ilustrativa como essa equação foi utilizada.

FIGURA 3—MÉTODO DE FRACIONAMENTO MOLECULAR COM CAPUZES CONJUGADOS (MFCC) EXEMPLIFICADO PELO CÁLCULO ENERGÉTICO DA INTERAÇÃO PROTEÍNA-LIGANTE ENTRE A NS5 RDRP E O LIGANTE INDA, ONDE EI (L - Rⁱ) = FRAGMENTO 1 - FRAGMENTO 2 - FRAGMENTO 3 + FRAGMENTO 4.



Fonte: Autoria própria a partir do software Discovery Studio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

DOCKING DA NS5 COM O COMPOSTO QUERCETINA

Através do *docking* molecular entre a proteína NS5 RdRp e o flavonoide quercetina, foram obtidos os resultados evidenciados na Tabela 1, ordenados na disposição dos complexos formados. A energia livre de ligação foi negativa em basicamente todos os complexos, tendo atingindo -5.28 kcal/mol. Enquanto, a energia intermolecular final apresentou resultados expressivamente negativos, atingindo -6.85 kcal/mol, esses dados implicam a afirmação de que é termodinamicamente mais favorável à existência das moléculas em um complexo do que separadas umas das outras. Em outras palavras, de maneira geral, ocorre uma atração e eficaz interação proteína-ligante¹¹. O *docking* simulado no AutoDock 4.2 também foi utilizado anteriormente para simular a interação entre a NS5 RdRp do ZIKV com os fármacos indinavir e acyclovir, obtendo menores energias livres entre -0,37 e -2,85 kcal/mol, e energias intermoleculares entre -2,16 e -6,65 kcal/mol, respectivamente¹².

Com relação às constantes de dissociação (K_i) calculadas para os complexos gerados, segundo a literatura, o K_i não é essencial para predição da correta estrutura do complexo proteína-ligante, mas é uma importante informação para prever a atividade biológica¹³. Nesse caso, a menor constante obtida para o complexo NS5 junto à quercetina foi o complexo 10 com 2.20 μ M. Esse resultado pode sugerir que essa conformação seja a de maior atividade com relação a NS5 RdRp.

TABELA 1– K_i OU CONSTANTE DE INIBIÇÃO EXPRESSA (CIE) EM μ M, ENERGIA ESTIMADA LIVRE (EEL) EM KCAL/MOL E ENERGIA INTERMOLECULAR FINAL (EIF) ESTIMADA PELO PROGRAMA AUTODOCK4 ENTRE A NS5 RDRP E O COMPOSTO FLAVONOIDE

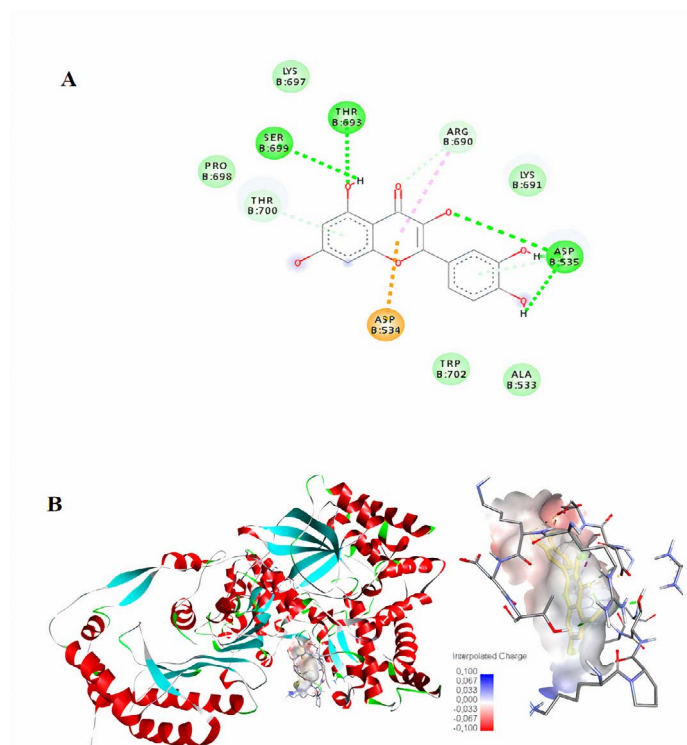
Complexo	Energia livre de ligação	Energia intermolecular	K_i
1	-4.26	-6.05	753.20
2	-3.42	-5.51	3090
3	-4.67	-6.46	377.39
4	-3.17	-4.96	4720
5	-5.06	-6.85	194.77
6	-3.83	-5.62	1560
7	-5.28	-3.49	2760
8	-3.02	-4.81	6110
9	-3.17	-4.96	4720
10	-3.62	-5.41	2.20

Fonte: A autoria própria.

Com os cálculos de *docking* da quercetina, utilizando o Discovery Studio, foi possível identificar as ligações ocorridas entre os aminoácidos de maior proximidade. Na Fig. 4A, são apresentadas as ligações moleculares resultantes dessa interação: ligação de hidrogênio com os aminoácidos Thr693, Ser699 e curiosamente ligada fortemente em três pontos ao aminoácido âncora Asp535, além de apresentar atração eletrostática com Asp 534. A fim de identificar o perfil energético que cerca essa interação, foi gerada uma nuvem energética na Fig. 4B, que representa através da coloração: Azul – perfil positivo; Transparente – perfil neutro; e Vermelho – perfil negativo, e se notou que o local de atracamen-

to está situado em uma região de interação neutra. As regiões mais próximas à ligação mostram-se negativas, demonstrando a atração da proteína pelo ligante em questão. O Asp535 é um dos aminoácidos responsáveis nessa interação.

FIGURA 4—A) DIAGRAMA BIDIMENSIONAL DA QUERCETINA E OS AMINOÁCIDOS INTERAGENTES DA PROTEÍNA NS5 RDRP. B) NUVEM ENERGÉTICA DE INTERAÇÃO DO LIGANTE (DENTRO DA NUVEM) COM OS AMINOÁCIDOS DO RECEPTOR.



Fonte: Autores a partir do software *Discovery Studio*.

Com a análise da interação molecular feita através do *docking*, é possível constatar a interação direta da quercetina com

o sítio da proteína, sendo assim um potencial inibidor da ação da proteína NS5 RdRp. Essa análise compactua com a literatura, sendo a quercetina um composto que apresenta atividade antiviral contra arbovírus. Um estudo na Malásia confirmou que a quercetina operava como inibidor do vírus da dengue, pois tem a capacidade de diminuir a abertura do vírus nas células, devido à interferência na ligação entre o vírus e a membrana da célula. Segundo o mesmo estudo, caso o vírus adentre a célula, a quercetina atua sobre a enzima responsável pela replicação viral¹⁴. Também foi demonstrada, em ensaios *in vitro*, a atividade virucida da quercetina sobre o parvovírus canino para avaliação do efeito antiviral: a redução do título viral foi de 93% para concentração de 3 micrograma/ml de quercetina incubada com vírus. No mesmo estudo, foi observada também a redução do título viral na dose dependente na concentração de 1,5 micrograma/ml em testes de determinação de atividade sobre a células¹⁵.

DOCKING NS5 COM O COMPOSTO LINALOL

Na Tabela 2, está exposta a análise referente ao linalol, o qual indicou energias intermolecular e livre expressivamente negativas nos dez complexos, obtendo respectivamente -5.34kcal/mol e -4.16kcal/mol, e mostrando uma evidência forte de boa interação termodinâmica proteína ligante. Através de uma metodologia semelhante, foi demonstrada *in silico* a detoxificação do herbicida Metsulfuron por uma enzima da superfamília Glutatio-na-Stransferases (GST) de arroz, obtendo uma menor energia livre de ligação entre o Metsulfuron e o modelo da OSGTU4 de -3,74 kcal/mol¹⁶. Essa metodologia também foi eficiente para avaliar a atividade de uma proteína PR-5 de *Poncirus trifoliata*, que teve atividade de beta-glucanase corroborada pelo *docking* com diferentes glucanas¹⁷. Esses trabalhos reforçam as amplas aplicações

da metodologia de *docking* molecular utilizada. A menor constante de dissociação (K_i) foi obtida no complexo 3 com 1520 μM .

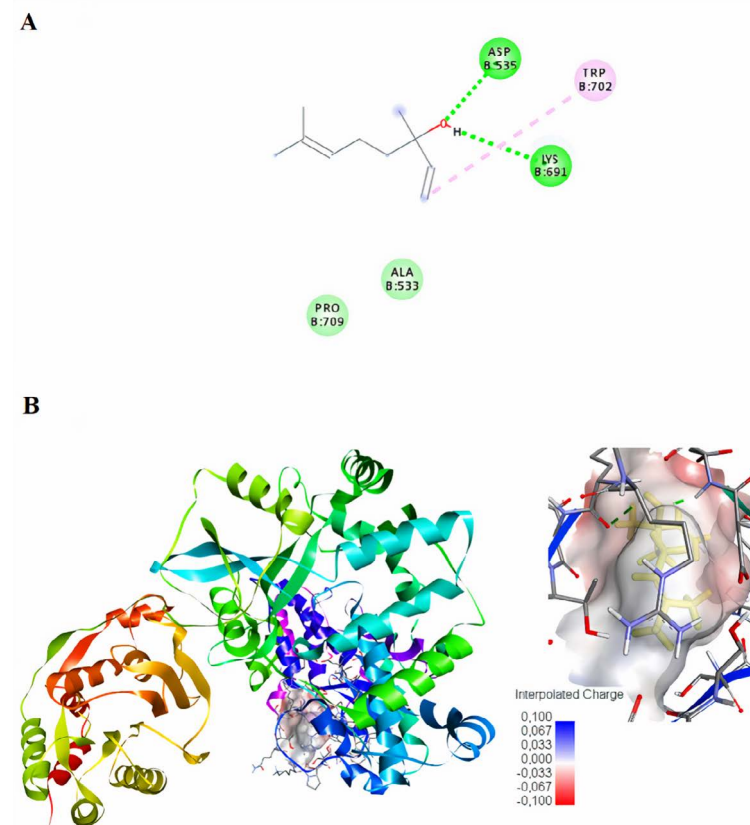
TABELA 2— K_i OU CONSTANTE DE INIBIÇÃO EXPRESSA (CIE) EM μM , ENERGIA ESTIMADA LIVRE (EEL) EM KCAL/MOL E ENERGIA INTERMOLECULAR FINAL (EIF) ESTIMADA PELO PROGRAMA AUTODOCK4 ENTRE A NS5 RDRP E O COMPOSTO TERPENÓ 3

Complexo	Energia livre de ligação	Energia intermolecular	K_i
1	-3.51	-5.00	2670
2	-3.63	-5.12	2180
3	-3.84	-5.34	1520
4	-3.05	-4.54	5850
5	-3.83	-5.33	1550
6	-3.22	-4.71	4360
7	-3.20	-4.69	4510
8	-3.01	-4.51	6170
9	-4.16	-5.65	893.30
10	-3.25	-4.75	4120

Fonte: Autoria própria.

Na Fig. 5A, é possível identificar as ligações ocorridas entre os aminoácidos de maior proximidade, apresentando ligação de hidrogênio com os aminoácidos LYS691 e o resíduo âncora Asp535, além de apresentar atração eletrostática com TRP702. A Fig. 5B evidencia a análise da nuvem eletrostática do receptor (NS5), feita a partir do *Discovery Studio*, permitindo notar que o local de atracamento está situado em uma região de interação neutra, porém as regiões mais próximas à ligação mostram-se negativas, sendo o Asp535, mais uma vez, um dos aminoácidos responsáveis nessa interação.

FIGURA 5—A) DIAGRAMA BIDIMENSIONAL DO LINALOL E OS AMINOÁCIDOS INTERAGENTES DA PROTEÍNA NS5 RDRP. B) NUVEM ENERGÉTICA DE INTERAÇÃO DO LIGANTE (DENTRO DA NUVEM) COM OS AMINOÁCIDOS DO RECEPTOR



Fonte: Autores a partir do software *Discovery Studio*.

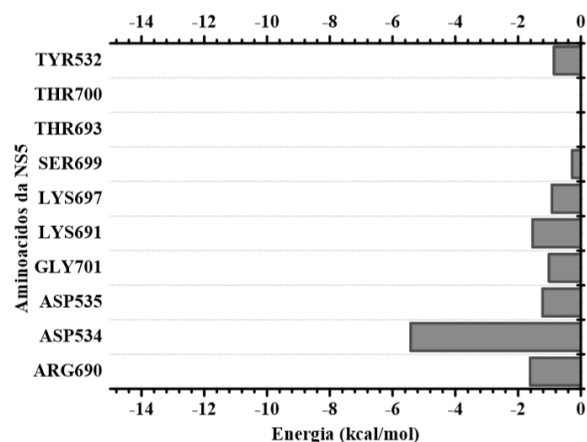
Até o presente momento, não se tem registros da utilização do linalol como composto antiviral. Alguns trabalhos evidenciam que a utilização do extrato vegetal fornece maior efeito larvicida contra *Aedes aegypti*¹⁸. A atividade antimicrobiana e antioxidante

do óleo essencial de ho-sho foi comprovada como ação antimicrobiana do óleo essencial sobre as bactérias testadas, além de comprovar a atividade antioxidante, atingindo valor máximo de 97,49%¹⁹. Sendo assim, o trabalho atual mostra indícios claros de uma possível ação deste composto também como antiviral.

MFCC PARA O COMPOSTO QUECERTINA

Os aminoácidos que apresentaram distância maior que 12Å foram desconsiderados para a etapa de realização dos cálculos utilizando MFCC. Através de cálculos de mecânica quântica e do método de fracionamento molecular com capuzes conjugados (MFCC), as energias de interação entre a proteína de replicação viral (NS5 RdRp) e os ligantes foram determinadas. A Fig. 6 evidencia todos os aminoácidos que se destacaram na interação entre a NS5 e o composto quecertina, estes foram: ARG690, ASP534, ASP535, GLY701, LYS691, LYS697, SER699, THR693, THR700 e TYR532.

FIGURA 6—ENERGIA DE LIGAÇÃO DOS PRINCIPAIS AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA NS5 COM O LIGANTE QUECERTINA.



Fonte: Autoria própria.

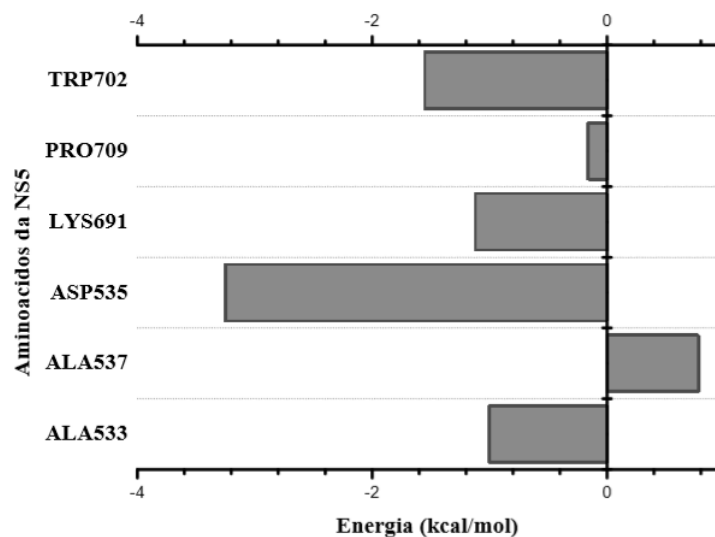
Partindo da lógica de análise do aminoácido que menos interagiu para o que mais interagiu, o THR693 e o THR700 obtiveram respectivamente 0,78 kcal/mol e 0,88 kcal/mol, demonstrando uma leve repulsão pelo ligante. O fato de estarem em um raio menor que 6Å do centroide do ligante indica que a variável distância nem sempre é primordial para a atratividade entre as moléculas. A SER 699 apresentou -0,28 kcal/mol de energia e distância de 6,99Å; o TYR532 demonstrou -0,86 kcal/mol e 9,62Å de distância; a LYS697 obteve -0,92 kcal/mol e 9,27Å de distância; a GLY701 demonstrou -1,01 kcal/mol de energia, o ASP535 indicou -1,22 kcal/mol de energia e 5,78Å de distância; a LYS 691 apresentou -1,54 kcal/mol de energia e 6,47Å de distância; a ARG690 indicou -1,62 kcal/mol e 6,45Å de distância; e o aminoácido com maior energia de interação foi o ASP534, com -5,42 kcal/mol de energia e uma distância de 4,86Å do centroide do receptor (NS5) até o ligante em questão.

Claramente o aminoácido ASP (ácido aspártico) obteve maior nível de atratividade, sendo responsável por 48,30% da interação entre a NS5 e o ligante quecertina, seguido da ARG (arginina) com 14,44%; e da LYS (lisina) com 13,72%.

MFCC PARA O COMPOSTO LINALOL

As energias evidenciadas na Fig. 7 demonstram que os aminoácidos em destaque na ligação participam de forma atrativa no complexo de interação entre a NS5 e o ligante linalol, tendo em vista as fortes energias negativas entre os seis aminoácidos (ALA533, ALA537, ASP535, LYS691, PRO709, TRP702) do receptor (NS5) com o ligante em questão.

FIGURA 7—ENERGIA DE LIGAÇÃO DOS PRINCIPAIS AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA NS5 COM O LIGANTE LINALOL.



Fonte: Autoria própria.

A ALA537 obteve valor energético de 0,78 Kcal/mol, demonstrando uma leve repulsa pelo terpeno (3), e sua distância do centro de massa foi de 9,57Å de distância; o PRO709 apresentou -0,16 Kcal/mol de energia e 9,26Å de distância; a ALA533 indicou -1,00 Kcal/mol de energia e 6,19Å de distância; a LYS 691 obteve -1,12 Kcal/mol de energia e 6,09Å de distância; o TRP702 apresentou -1,55 Kcal/mol de energia e 9,12Å de distância; e o aminoácido com maior participação nesta interação foi o ASP535, com -3,24 Kcal/mol de energia e distância de 5,44Å do centro de massa do ligante.

Desse modo, o ácido aspártico (ASP) foi o aminoácido com maior participação efetiva na atratividade entre o complexo formado pela NS5 e o composto linalol, representando 51,58% da energia do sistema; os outros dois aminoácidos de maior interação foram o TRP (triptofano) com 24,60% e a LYS (lisina) com 17,77%.

ENERGIA TOTAL OBTIDA ATRAVÉS DO MÉTODO DE FRACIONAMENTO DE CAPS E CONJUGADOS (MFCC)

Os cálculos *ab initio* descrevem propriedades de transporte eletrônico de junções moleculares (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014). A disposição do balanço de energia final ($E(L - R^i) = E(L + C^{1-i} R^i C^{i+1}) - E(C^{1-i} R^i C^{i+1}) - E(L + C^{1-i} C^{i+1}) + E(C^{1-i} C^{i+1})$) reflete a contribuição individual de cada aminoácido na interação entre a o receptor (proteína NS5) e os ligantes quercetina e linalol. Os dois ligantes mostraram-se eficientes na ligação com o receptor, tendo em vista os valores altamente negativos em sua energia quântica de interação. De acordo com os cálculos realizados, o balanço energético total do linalol obteve -6,30 Kcal/mol, e da quercetina, -11,22 Kcal/mol de energia total.

Outra forma interessante para interpretação destes resultados é a transformação da unidade Kcal/mol para eV (eletrovolts); para a química, a partir de -1eV, a ligação entre as moléculas pode ser considerada do tipo covalente²⁰. O linalol com -0,27eV e a quercetina obtiveram em seu balanço quântico de energia final de -0,48eV. Com isto, é possível afirmar que todos os seis compostos se mostraram negativamente expressivos, sendo demonstrado quanticamente que os ligantes têm alta afinidade pela proteína (MOTA, 2016), entretanto os dois compostos não apresentaram evidência *in silico* da formação de ligação covalente no sítio ativo da NS5 RdRp, o que não caracteriza, *stricto sensu*, como uma inibição irreversível²¹.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da análise dos dados obtidos, considerando os aspectos da metodologia utilizada e do sistema em estudo, pode

ser concluído que a metodologia aplicada foi capaz de selecionar e testar compostos para a elucidação de possíveis moléculas com potencial antiviral. Os dois compostos testados apresentaram baixas constantes de inibição (K_i); a energia livre de ligações e a energia intermolecular de todos os complexos foram altamente negativas, podendo-se afirmar que são termodinamicamente favoráveis, ou seja, a existência destas moléculas em um complexo é preferível (em quesitos de gasto energético) do que a proteína sozinha; Os compostos tiveram interação direta com o sítio ativo da proteína; o aminoácido âncora ASP535 foi o responsável por todas as interações evidenciadas no *docking*, estabelecendo ligação de hidrogênio; o balanço energético, mesmo sem alcançar o âmbito de ligação covalente, demonstrou que os ligantes linalol e quercetina apresentam aminoácidos ligados, apontando a energia total do complexo proteína ligante negativa.

Os resultados deste trabalho mostraram-se altamente promissores, indicando estes dois compostos com potencial antiviral para inibição da proteína NS5 RdRd, tendo em vista as várias evidências de excelente e favorável interação demonstradas através das técnicas de *docking* molecular e fracionamento de CAPS conjugados. Logo, estes podem auxiliar no desenvolvimento de um futuro fármaco que possa intervir na efetividade do vírus da zika.

REFERÊNCIAS

1. CARVALHO, O. V. et al. Potencial antiviral da quercetina sobre o parvovírus canino. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.65, n.2, p. 353358, Belo Horizonte, 2013.
2. SENADO FEDERAL. 2019. Brasil tem 48% da população sem esgoto. Disponível em: <<https://www12.senado.leg.br/noticias/materias/2019/09/25/brasil-tem-48-da-populacao-sem-coleta-de-esgoto-diz-instituto-trata-brasil>>. Acesso em abril de 2020.
3. ZANLUCA C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 110:569–72, 2015.
4. GODOY, A. et al. Crystal structure of Zika virus NS5 RNA-dependent RNA polymerase. *Nature Communications*. VL–8, 2017.
5. WILLIS, R.C., (2002), “Surveying the binding site”, *Modern Drug Discovery*, September, pages 28-34
6. BIOVIA DISCOVERY STUDIO VISUALIZER. 2014. Disponível em: <http://accelrys.com/products/datasheets/discovery-studio-visualizer.pdf>. Acesso em: jul de 2018.
7. U.S National Library of Medicine. Nacional center for Biotechnology Information. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: jul de 2018.
8. Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry*, 30(16), 2785-2791. Accessed July 24, 2019.
9. ZHANG, D. W.; ZHANG, J. Z. H. Molecular fractionation with conjugate caps for full quantum mechanical calculation

- of protein-molecule interaction energy. *Journal of Chemical Physics*, 119, 3599-605, 2003.
10. GORDON, M. S.; FEDOROV, D. G.; PRUITT, S. R.; SLIP-CHENKO, L. V. *Fragmentation methods: a route to accurate calculations on large systems*. *Chem. Ver.*, 112, 632-672, 2012.
 11. MOTA, K. B.; LIMA NETO, J. X.; LIMA COSTA, A. H.; OLIVEIRA, J. I. N.; BEZERRA, K. S.; ALBUQUERQUE, E. L.; CAETANO, E. W. S.; FREIRE, V. N.; FULCO, U. L. *A quantum biochemistry model of the interaction between the estrogen receptor and the two antagonists used in breast cancer treatment*. *Comp. and Theor. Chem.*, 1089, 21-27, 2016.
 12. Farias, H.M.; Mederos, R.L.; Nóbrega, F.F.F; Maia, R.T. (2019). *Investigação In Sílico Da Eficácia De Fármacos Antivirais Na Inibição Da Ns5 Do Vírus Da Zika*. MARTINS, R.E. *Introduction To Bioinformatics*. P.73-84.
 13. KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. *Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications*. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 3, p. 935-949, 2004.
 14. CRFRJ.2016. *Pesquisadores brasileiros testam remédio contra dengue, zika e chikungunya*. Disponível:<<http://crf-rj.org.br/noticias/2206-pesquisadores-brasileiros-testam-remedio-contra-dengue-zika-e-chikungunya.html>>. Acesso: jun. 2018.
 15. CARVALHO, O. V. et al. *Potencial antiviral da quercetina sobre o parvovírus canino*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.65, n.2, p. 353358, Belo Horizonte, 2013.
 16. AMADOR, V. C.; MELO, G. G.; CAMPOS, I. C. P.; BRAZ, L. C. C.; MAIA, R. T. *Evidência in silico de detoxificação do herbicida Metsulfuron por uma GST de arroz*. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA E ENSINO EM CIÊNCIAS, 1, 2016, Campina Grande. *Anais...* Campina Grande: Editora Realize, 2016.
 17. ABREU, R. A. *Caracterização funcional e estrutural comparativa in silico de uma proteína PR-5 do tipo taumatina de Poncirus trifoliata*. 2015. 48 f. Monografia (Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos)–Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, Universidade Federal de Campina Grande, Sumé–PB. 2015.
 18. PEREIRA, Álvaro Itaúna Schalcher et al. *Atividade antimicrobiana no combate as larvas do mosquito Aedes aegypti: Homogeneização dos óleos essenciais do linalol e eugenol*. **Educación química**, v. 25, n. 4, p. 446-449, 2014.
 19. CANSIAN, Rogério Luis et al. *Atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de ho-sho (Cinnamomum camphora Ness e Eberm Var. Linaloolifera fujita)*. **Food Science and Technology**, v. 30, n. 2, p. 378-384, 2010.
 20. JAURIS, Iuri Medeiros, et al. *Adsorção do fármaco nimesulida em nanoestruturas de carbono*. *Disciplinarum Scientia | Naturais e Tecnológicas*, 2015, 16.2: 245-256.
 21. BARREIRO, Eliezer J.; FRAGA, Carlos Alberto Manssour. *Química Medicinal-: As bases moleculares da ação dos fármacos*. Artmed Editora, 2014.

EFEITOS DA RETICULAÇÃO COM GENIPINA EM MEMBRANAS DE QUITOSANA/COLÁGENO PARA POTENCIAL USO COMO BIOMATERIAL

Felipe Ravelly Alves de Souza

Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências – UFPE
Recife-PE–feliperavelly_mh@hotmail.com

Franklin Ferreira de Farias Nóbrega

Universidade Federal de Campina Grande, CDSA – UFCG
Sumé – PB–franklinnobrega@yahoo.com.br

Rosemberg Cardoso Barbosa

Universidade Federal de Campina Grande, CERTBIO – UFCG
Campina Grande – PB–rcbvvet@gmail.com

Alecsandra Ferreira Tomaz

Universidade Federal de Campina Grande, CERTBIO – UFCG
Campina Grande – PB–alecsandratomaz@hotmail.com

INTRODUÇÃO

A biotecnologia é uma área multidisciplinar que visa ao desenvolvimento de produtos ou processos biológicos com a ajuda da ciência e da tecnologia, podendo ser definida como qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos, ou seus derivados, para fabricar ou modificar produtos ou processos para utilização específica. Dessa forma, o estudo dos biomateriais (dispositivos que entram em contato com sistemas biológicos) surge como uma das inúmeras ramificações dessa ciência, apresentando potencial promissor devido às inúmeras contribuições para a evolução da medicina^{1,2}.

Os biomateriais poliméricos estão entre os mais empregados na medicina regenerativa, principalmente quanto ao tratamento

de feridas e à liberação controlada de fármacos, devido às suas vantagens no que diz respeito a maleabilidade, custo, propriedades mecânicas, biocompatibilidade e biodegradabilidade, permitindo o desenvolvimento de materiais alternativos com baixa toxicidade e que apresentam eficiência no reparo de tecidos^{3,4,5,6,7}.

A quitosana, por exemplo, é um biopolímero composto por cadeias de N-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina ligadas por meio de ligações $\beta \rightarrow (1-4)$, insolúvel em água e meio básico e solúvel em soluções ácidas. Esse polímero é obtido a partir da desacetilação da quitina, principal constituinte dos micélios dos fungos e do exoesqueleto de insetos e crustáceos. Apresenta propriedades interessantes para aplicação em engenharia de tecido, tais como biocompatibilidade e biodegradabilidade, acelera a recuperação de lesões, reduz o nível do colesterol sanguíneo, estimula os efeitos do sistema imunológico, além de possuir um comportamento bactericida e fungicida^{4,8,9}.

Entretanto, algumas das propriedades desse polímero não são adequadas o suficiente para que seja capaz de competir com alguns polímeros sintéticos já disponíveis no mercado. Uma possível alternativa a este problema seria a formulação de um novo material através da utilização de quitosana em conjunto com outros polímeros, como o colágeno, a fim de adquirir um biomaterial que apresente as características desejadas^{8,10}.

O termo colágeno é utilizado para denominar uma família de, pelo menos, 27 isoformas de proteínas que podem ser encontradas em tecidos conjuntivos ao longo do corpo de várias espécies, como ossos, tendões, cartilagem, veias, pele, dentes e músculos. Esse polímero constitui cerca de 30% de toda a matéria-prima orgânica do corpo dos animais e 60% das proteínas totais do corpo¹¹.

Sendo constituído por três cadeias polipeptídicas, unidas por pontes de hidrogênio e enroladas uma em torno da outra em um arranjo helicoidal na sua porção central e nas extremidades

amínica e carboxílica, permanecendo na forma globular. O colágeno do tipo I é o mais abundante e o principal componente da matriz extracelular, sendo um substrato natural para as células, orientando e estimulando a formação tecidual. Estas características, juntamente com a biocompatibilidade e a estabilidade do colágeno, o tornam atrativo para a confecção de biomateriais de diferentes formas e aplicações, como membranas e esponjas para revestimento de queimaduras, géis para hemostasia e suporte para o crescimento de células^{2,11,12}.

Diversas são as alternativas de promover uma interação entre dois polímeros, podendo-se partir desde uma simples solubilização destes em um solvente comum, até a indução para formação de ligações de entrecruzamento. As ligações de entrecruzamento, *crosslinking* ou reticulação são um processo que pode ocorrer de duas formas: I) Reticulação física (RF), iônica ou reversível, que se dá através de interações de caráter reversível, como ligações iônicas ou interações secundárias; e II) Reticulação química (RQ), covalente ou irreversível, quando ocorre a formação de uma rede polimérica, ou seja, uma reação entre uma unidade estrutural de um polímero e outra unidade estrutural do mesmo ou de outro polímero^{12,13,14}.

A RQ se sobressai em relação à RF, pois, ao contrário da reticulação reversível, a irreversível melhora as propriedades mecânicas e reduz a sua dispersão do local, além de que outras propriedades como gelificação, tamanho de poros, velocidade de degradação e dissolução são mais fáceis de controlar¹³.

Entre as inúmeras possibilidades de realizar a reticulação química, há uma limitação no uso de determinados agentes, como o glutaraldeído, principalmente devido a suas propriedades tóxicas. Entretanto, a genipina – biomolécula extraída do jenipapo (*Genipa americana L.*) tem apresentado um enorme potencial, pois, além da biocompatibilidade, ela fortalece a estrutura do biomaterial por meio da formação de ligações covalentes intermoleculares

permanentes, adicionando ou adequando propriedades que são de interesse para a engenharia de tecidos^{9, 15, 16}.

A reticulação com genipina é influenciada pelo pH do meio reacional, sendo que, de modo geral, em pHs próximos da neutralidade, a genipina reage com materiais que contêm grupos amina, como a quitosana e alguns outros polímeros, através de duas reações principais: na primeira, por meio de um ataque nucleofílico, há a substituição do grupo éster da genipina por uma ligação do tipo amida secundária; na segunda, por meio de outro ataque nucleofílico, há a formação de um grupo aldeído intermediário seguido da formação de uma amina terciária na estrutura cíclica da genipina. Dessa forma, a reticulação de quitosana/colágeno com esta biomolécula pode fortalecer a estrutura do biomaterial por meio da formação de ligações covalentes intermoleculares permanentes, adicionando ou melhorando propriedades que são de interesse para a área médica, como estabilidade térmica, taxa de degradação, propriedades mecânicas, hidrofobicidade e porosidade, permitindo, por exemplo, a liberação controlada de fármacos^{9, 17, 18}.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da reticulação com genipina em membranas de quitosana/colágeno, utilizando o extrato alcoólico do jenipapo como rota alternativa à obtenção de biomateriais de baixo custo para utilização na engenharia de tecidos.

METODOLOGIA

Procedeu-se com a extração do colágeno a partir de membranas da casca do ovo, previamente higienizadas, através de uma solução de hidróxido de sódio 1 M, seguido da neutralização com ácido láctico¹⁸ e produção das membranas de quitosana/colágeno

por meio da técnica de evaporação do solvente (ácido acético 1%) em duas formulações diferentes: membranas de quitosana (MQ) a 2% (m/v) e membranas de quitosana a 2% (m/v) com 5% de colágeno (m/m) (MQC)²⁰.

Para a reticulação desses materiais, foram consideradas três situações: I) controle negativo (G1), membranas sem reticulação; II) reticulação com genipina comercial (G2) diluída em álcool isopropílico a 0,25% (m/v); e III) reticulação com o extrato alcoólico do jenipapo (G3), obtido através da submersão da polpa do jenipapo em álcool isopropílico na proporção de 1:2,5 (m/v). Buscou-se a formação das ligações de entrecruzamento através da submersão das membranas nas soluções reticulantes por 6 horas, à temperatura ambiente e com exposição à luz. Foram utilizadas as seguintes denominações: MQ1 e MQC1 – membranas submetidas à condição G1; MQ2 e MQC2 – membranas reticuladas com G2; e MQ3 e MQC3 – membranas reticuladas com G3.

Por fim, as MQ e MQC, nas condições G1, G2 e G3, foram padronizadas (tamanho das amostras) de acordo com as necessidades de cada ensaio, levadas à estufa numa temperatura de 40°C por 24 horas e encaminhadas para caracterização por Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR); Microscopia Óptica (MO); Termogravimetria (TGA); Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC); Ensaio Mecânico de Tração; Molhabilidade; Intumescimento; Biodegradação; e Citotoxicidade.

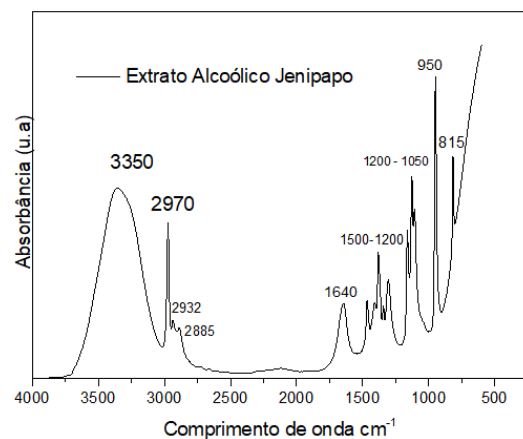
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a produção das membranas, as MQ apresentaram uma maior homogeneidade na sua estrutura, quando comparadas às MQC. Entretanto, as membranas diminuíram, em média, 11,79 mm após a neutralização em atmosfera de hidróxido de

amônia a 4%, retornando ao seu tamanho original quando absorvem umidade. Essa diminuição está associada diretamente à insolubilidade da quitosana em meio alcalino, pois, ao entrarem em contato com este meio, as moléculas tendem a se contrair.

Antes de proceder com a reticulação das membranas, o extrato alcoólico do jenipapo (G3) foi submetido a um FTIR (Fig. 1), cujas ligações correspondentes às bandas foram identificadas e comparadas às bandas características da genipina pura. No espectro, identificou-se o grupamento hidroxila (O-H) por volta de 3350 cm^{-1} ; entre 2750 e 3000 e em 1640 cm^{-1} uma conformação vibracional de estiramento (deformação axial) do grupo C=C; nas bandas entre 1200 e 1500 cm^{-1} , observaram-se vibrações que podem ser atribuídas a ligações como CH₂, CH₃, NH e à presença de anéis heterocíclicos; em meio às bandas que compreendem de 1050 a 1200 cm^{-1} , notou-se a presença de vibrações que correspondem ao CO (éteres cíclicos), característico de álcoois e fenóis; por fim, nas bandas em torno de 815 e 950 cm^{-1} , uma deformação angular (dobramento) fora do plano, relacionado a anéis aromáticos e alcenos (RCH=CH₂), respectivamente^{21,22}.

FIGURA 1— FTIR DO EXTRATO ALCOÓLICO DO JENIPAPO (G3)



Dessa forma, observa-se que o espectro da solução G3 apresenta bandas características da genipina, como alcenos, alcanos, álcoois, ésteres, éteres cíclicos e anéis heterocíclicos, porém aparecem em menor intensidade quando comparado à genipina comercial. Isso acontece devido à realização do ensaio no extrato não desidratado, ou seja, diluído em álcool isopropílico, como também à presença de outras substâncias do fruto que também são solúveis em álcool. Contudo, pode-se afirmar que a genipina encontra-se diluída na solução e misturada a outras substâncias presentes no jenipapo.

Após os procedimentos de reticulação, MQ1 e MQC1 não apresentaram nenhuma modificação aparente; MQ2 e MQC2, por sua vez, demonstraram uma leve alteração na sua coloração para um tom mais amarelado; enquanto que as MQ3 e MQC3 apresentaram uma coloração esverdeada. Essas alterações nas membranas aconteceram porque a genipina reagiu com algumas proteínas na presença de luz e oxigênio, mudando a sua coloração.

CARACTERIZAÇÕES DAS MEMBRANAS

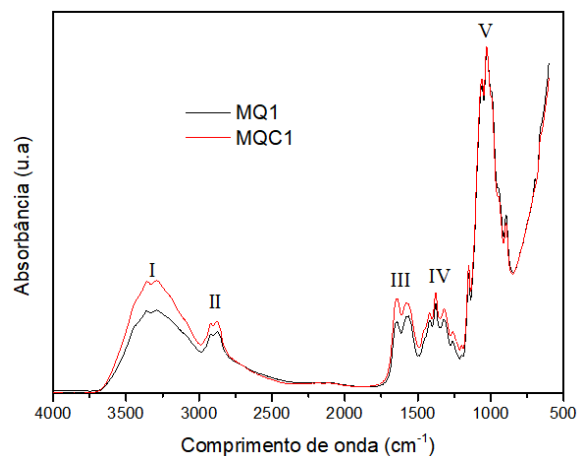
ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

O FTIR foi realizado com o intuito de determinar a presença dos grupos funcionais nas amostras, utilizando o equipamento Spectrum 400 Perkin Elmer FTIR/FTNIR Spectrometer à temperatura ambiente, com faixa de varredura que foi de 4000 a 600 cm^{-1} . As membranas de quitosana (MQ1) e quitosana/colágeno (MQC1) sem reticulação apresentaram vibrações características na região do infravermelho a membranas de quitosana, sendo que, na MQC1, houve um aumento na intensidade das vibrações de ligações que

estão presentes tanto na quitosana quanto no colágeno, indicando que houve a incorporação do colágeno à estrutura da quitosana.

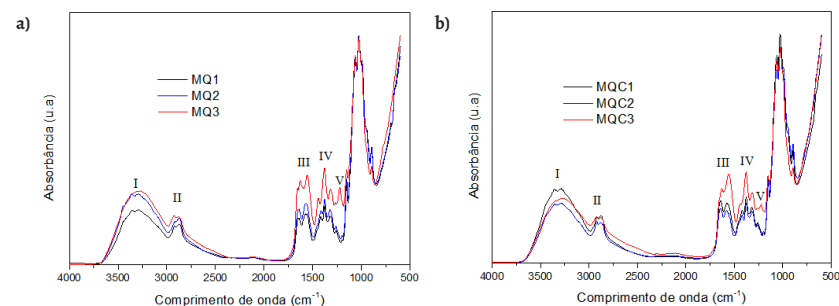
Como pode-se observar na Fig. 2, a banda I, com comprimento de onda entre 3361 e 3280 cm^{-1} , corresponde às vibrações de estiramento dos grupos OH e NH; a banda II, com 2876 cm^{-1} , é atribuída à vibração de estiramento do grupo CH; a III, com 1649 cm^{-1} , corresponde ao modo de vibração por estiramento da ligação C=O ou à deformação axial C=O da amida primária; já no comprimento de onda equivalente a 1580 cm^{-1} , é atribuída a deformação da ligação -NH da amina; na região IV, 1378 cm^{-1} , está relacionada a deformação angular simétrica do grupo -CH₃; na banda V, 1150 cm^{-1} , 890 cm^{-1} e 1064 cm^{-1} estão atribuídas às vibrações de estiramento do grupo C-O-C, característica da estrutura sacarídica da quitosana. A presença das bandas C=O e N-H, bem como a banda de absorção em 1378 cm^{-1} , que é característica da deformação angular simétrica do grupo -CH₃, em conjunto, indicam a presença de grupos acetamidos, pois a quitosana não está 100% desacetilada^{20, 23, 24}.

FIGURA 2—FTIR DAS MEMBRANAS MQ1 E MQC1



Ao observar a Fig. 3a, pode-se afirmar que a solução G2 e a G3 proporcionaram a reticulação das membranas de quitosana (MQ2 e MQ3, respectivamente), sendo que a reticulação com G3 foi mais perceptível, provavelmente devido à diferença de concentração do agente reticulante (genipina) na solução, uma vez que houve um aumento na intensidade de absorção na banda III e IV, associado ao ataque nucleofílico, onde há a substituição do grupo éster da genipina por uma ligação do tipo amida secundária da quitosana; em seguida, no aparecimento da banda V, indicando a introdução de um grupamento amina terciária no anel diidropirano da genipina^{17, 21, 25}.

FIGURA 3— A) FTIR DAS MEMBRANAS MQ1, MQ2 E MQ3; E B) MQC1, MQC2 E MQC3



No FTIR das membranas de quitosana/colágeno (MQC1, MQC2 e MQC3), conforme apresentado na Fig. 3b, também indica que houve a reticulação na MQC3, uma vez que foram observados os mesmos eventos descritos anteriormente nas bandas III, IV e V, entretanto, na MQC2, a reticulação não foi perceptível através da análise da FTIR, pois houve uma diminuição na intensidade de algumas vibrações, resultado que pode estar associado à baixa concentração de genipina na solução G2, contudo a reticulação pode ser comprovada através da análise dos demais resultados.

A microscopia óptica foi realizada para analisar a superfície da amostra em relação a sua topografia e morfologia, utilizando o microscópio Hirox KH-1300, com aumento de 120×, através do método de iluminação por transmissão de luz visível. As imagens obtidas foram tratadas com o software Gwyddion e analisadas. Nas membranas de quitosana, a análise microscópica revelou uma maior homogeneidade na superfície da MQ3, quando comparada a MQ1 e MQ2, indicando que a reticulação com genipina alterou parâmetros como ondulação e rugosidade das membranas. As membranas de quitosana/colágeno, por sua vez, apresentaram resultados semelhantes às membranas de quitosana, pois MQC3 também apresentou maior homogeneidade quando comparada a MQC1 e MQC2.

Essas alterações nos parâmetros morfológicos nas membranas de quitosana e quitosana/colágeno estão evidenciados na Tabela 1, na qual se nota que ocorreu uma diminuição nanométrica da espessura do material, a qual está relacionada ao processo de reticulação, pois quanto maior a concentração do agente reticulante menor é a expansão do polímero reticulado²²⁻²⁶. Além disso, é possível evidenciar que a condição de reticulação G3 proporcionou maior eficiência na compactação das amostras, resultado que pode ser observado através da análise de variação da rugosidade (Ra) e ondulação (Wa), sendo que a MQC3 foi a mais suscetível a essa compactação quando comparada a MQ2, MQ3 e MQC2, indicando que a presença do colágeno na estrutura também influenciou no processo de reticulação.

TABELA 1 – PARÂMETROS MORFOLÓGICOS DAS MEMBRANAS

Membranas	Rugosidade média – Ra (nm)	Pico da Rugosidade – Rp (nm)	Ondulação média – Wa (nm)	Ondulação máxima – Wy (nm)
MQ1	80,16	227,09	49,97	171,68
MQ2	71,31	168,51	37,72	191,54
MQ3	19,29	78,71	34,56	167,90
MQC1	110,24	274,69	35,32	151,61
MQC2	63,20	140,89	30,63	104,17
MQC3	30,97	115,86	22,82	80,90

TERMOGRAVIMETRIA (TGA)

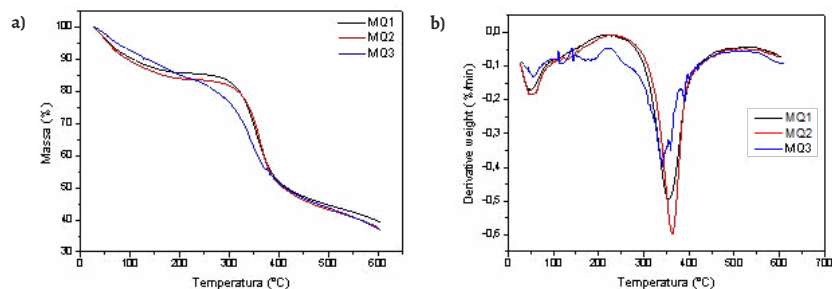
A TGA foi efetuada para avaliar o percentual de perda de massa das amostras e, conseqüentemente, a estabilidade térmica das membranas. Para isso, utilizou-se o PYRIS 1 TGA da Perkin Elmer a uma taxa de aquecimento de 10°C/min, aumentando a temperatura de 30 a 600°C em meio atmosférico (71% de nitrogênio e 29% de oxigênio) com fluxo de 20 mL/min.

Com base nas curvas termogravimétricas das membranas de quitosana (Fig. 4a) e com auxílio de suas derivadas (Fig. 4b), pode-se afirmar que a MQ1 apresentou duas etapas de perda de massa (P.M), enquanto as membranas reticuladas (MQ2 e MQ3) apresentaram três etapas. A primeira etapa está relacionada à volatilização do solvente e desidratação das membranas. Na segunda etapa, ocorre a desacetilação e despolimerização dos compostos, em outras palavras, ocorre a degradação do material. A terceira

etapa, por sua vez, está relacionada à perda de cinzas resultante da degradação dos compostos^{19, 20}.

Em uma análise detalhada da TGA/DTG, pôde-se aferir as etapas em que houve perda de massa e seus respectivos ranges de temperatura, evidenciando que a reticulação proporcionou uma redução na temperatura de transição da etapa I para a II e a introdução de uma terceira etapa no processo de degradação das membranas de quitosana, indicando que a reticulação influenciou na estabilidade térmica do material, diminuindo a sua resistência a temperatura.

FIGURA 4– A) CURVA TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA) DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA; E B) SUA DERIVADA (DTG)

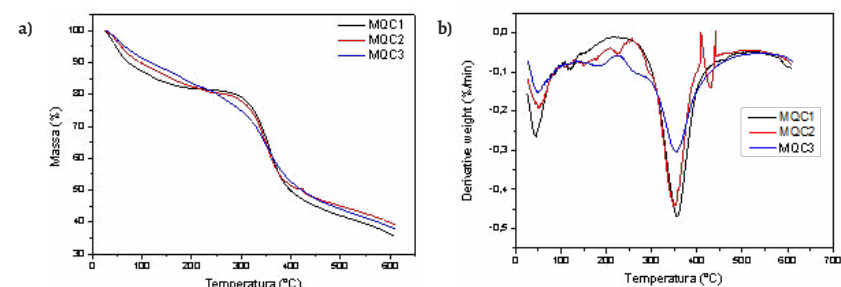


As curvas termogravimétricas das membranas de quitosana/colágeno (Fig. 5a) e suas respectivas derivadas (Fig. 5b), por sua vez, apresentaram três etapas na perda de massa em MQC1 e apenas duas etapas em MQC2 e MQC3.

Dessa forma, ao contrário das membranas de quitosana, a reticulação nas membranas de quitosana/colágeno proporcionou um aumento na temperatura de transição da etapa I para a etapa II e a remoção da etapa 3 do range de temperatura utilizado, indicando que a reticulação também influenciou na estabilidade térmica desse material, aumentando a sua resistência à tempera-

tura, pois, como sabemos, o processo de reticulação é diretamente proporcional à estabilidade térmica da amostra, ou seja, quando a reticulação é baixa, a tendência é diminuir a estabilidade térmica, porém, quando a reticulação é aumentada até certo ponto, essa estabilidade também tende a aumentar, influenciando na temperatura de decomposição do material^{20, 27}.

FIGURA 5– A) CURVA TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA) DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA/COLÁGENO; B) SUA DERIVADA (DTG).



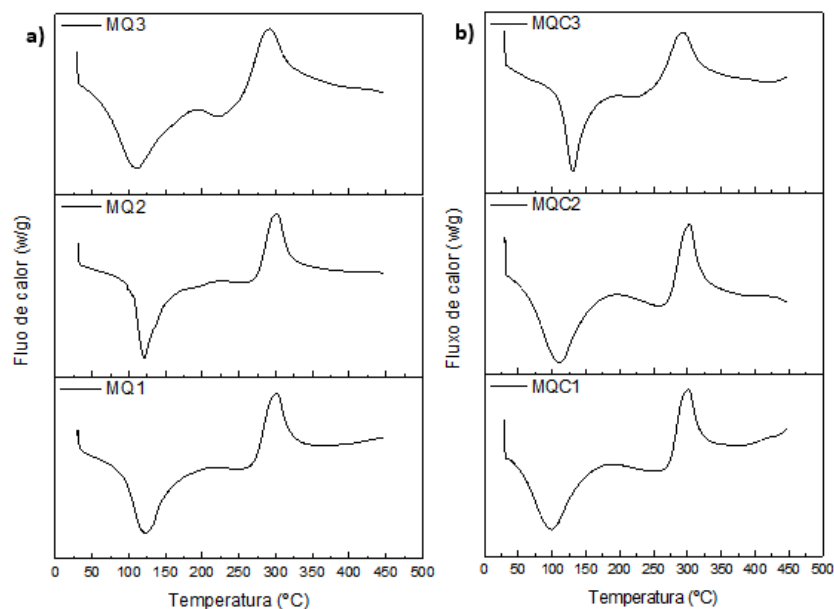
CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foi realizada em um DSCQ20 da TA Instruments, com uma temperatura que variou de 30 a 400°C, sob taxa de aquecimento de 10°C/min e atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min, com o objetivo de complementar a TGA, avaliar as transições de fases e observar se houve mudanças nas propriedades térmicas das membranas proporcionadas pela reticulação.

As curvas do DSC para as membranas de quitosana apresentaram dois picos: um endotérmico, alusivo à evaporação de substâncias voláteis; e outro exotérmico, relacionado à degradação do material, como se observa na Fig. 6a. O primeiro pico, endotérmico, ocorreu na temperatura de 122,78°C para MQ1, 119,57°C

para MQ2 e 109,94°C para MQ3, mostrando-se compatível com o resultado obtido pela termogravimetria, comprovando que a reticulação diminuiu a estabilidade térmica da membrana de quitosana, sendo que a solução G3 proporcionou uma redução mais considerável quando comparada a G2. Os picos exotérmicos foram observados nas temperaturas de 300,63, 299,26 e 289°C para MQ1, MQ2 e MQ3, respectivamente.

FIGURA 6– A) CURVA DE DSC DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA E B) QUITOSANA/ COLÁGENO



Nas membranas de quitosana/colágeno, as curvas do DSC também apresentaram dois picos: um endotérmico e outro exotérmico (Fig. 6b). Os picos endotérmicos e exotérmicos foram observados nas temperaturas de 99,37 e 300,56°C para MQC1, 109,27 e 301,98°C para MQC2 e, 131,13 e 292,57°C para MQC3. Resultado que

também se mostra compatível com o obtido pela termogravimetria, indicando que a reticulação nas membranas de quitosana/colágeno, ao contrário das membranas de quitosana, aumentou a estabilidade térmica do material e, conseqüentemente, a sua resistência à temperatura, sendo que, mais uma vez, a solução G3 supera o resultado obtido por G2.

Em uma abordagem mais ampla, observa-se que a reticulação com genipina diminuiu a temperatura do pico endotérmico das membranas de quitosana, ao mesmo tempo em que aumentou nas membranas de quitosana/colágeno, indicando que a presença do colágeno na estrutura das membranas influenciou no processo de reticulação. Nota-se também que a genipina, em ambas as soluções (G3 e G2), proporcionou um maior grau de reticulação (GR) na MQC e menor na MQ. Essa alteração ocorre, pois, com a elevação do GR, reduzindo a porosidade do material, a permeabilidade à água e a difusão de substâncias aprisionadas nas redes poliméricas. Por outro lado, a reticulação promoveu uma diminuição nas temperaturas dos picos exotérmicos, com exceção da MQC2, que apresentou um leve aumento (não relevante).

A seleção de métodos de esterilização para materiais destinados à área médica deve levar em consideração aspectos físicos e químicos do material, uma vez que os dispositivos médicos costumam ser sensíveis a altas temperaturas apresentadas pela esterilização por vapor de autoclave, tornando a técnica raramente empregada para esterilização de filmes poliméricos utilizados na produção de bandagens adesivas²⁸. No entanto, a MQC3, como já foi mencionado, apresentou um pico endotérmico de 131,13°C, característica que aumenta as possibilidades de esterilização desse material para meios que utilizam alta temperatura, como a autoclavagem, sem que haja o comprometimento da sua estrutura polimérica.

ENSAIO MECÂNICO DE TRAÇÃO

O ensaio mecânico de tração, por sua vez, foi realizado com três amostras por grupo em uma INSTRON, modelo 3366, com célula de carga de 500N e uso de extensômetro mecânico à temperatura ambiente e velocidade de deslocamento do travessão de 5 mm/min, seguindo a norma ASTM D882-91²⁹.

De acordo com as propriedades mecânicas das membranas obtidas neste ensaio (Tabela 2), as membranas de quitosana/colágeno sem reticulação (MQC1) apresentaram resistência à tensão inferior às membranas de quitosana sem reticulação (MQ1), entretanto uma taxa de deformação superior. Isso acontece porque o colágeno perde resistência mecânica após sua extração, propriedade que pode ser melhorada através da reticulação³⁰.

Após submeter as membranas de quitosana às condições G2 e G3, observou-se que a reticulação com genipina aumentou a resistência à tensão das membranas de quitosana (MQ2 e MQ3), diminuindo a sua taxa de deformação. Por outro lado, a reticulação das membranas de quitosana/colágeno com G2 não apresentou resultado expressivo quanto ao parâmetro de resistência à tensão, embora também tenha diminuído a taxa de deformação do biomaterial G3, que, por sua vez, aumentou a resistência à tensão das membranas de quitosana/colágeno (MQC3), assim como diminuiu a sua taxa de deformação.

De forma a validar os resultados apresentados, realizou-se uma análise de variância (ANOVA) com intervalo de confiança de 95% através do software IBM SPSS Statistics Subscription, em que se constatou que houve efeito da reticulação tanto na resistência à tensão das membranas [$F(5,12)=4,869$; $p < 0,05$] quanto na deformação [$F(5,12)=4,377$; $p < 0,05$]. Além disso, por meio dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, verificou-se que as amostras possuem distribuição normal e suas variâncias são homogêneas, uma vez que $p > 0,05$ em ambos.

TABELA 2– VALORES MÉDIOS DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA E QUITOSANA/COLÁGENO PARA OS DOIS ENSAIOS

Membranas	Resistência a Tensão (MPa)	Deformação (%)
MQ1	65,71 ± 3,49	7,94 ± 1,57
MQ2	69,92 ± 6,53	6,92 ± 0,77
MQ3	70,39 ± 9,98	5,07 ± 0,85
MQC1	49,12 ± 5,14	9,82 ± 3,04
MQC2	47,61 ± 7,49	5,23 ± 0,74
MQC3	59,34 ± 11,85	4,98 ± 1,44

Levando em consideração a utilização do biomaterial para aplicações médicas, tem-se que as membranas com menor deformação e valores razoáveis de resistência à tração possuem elevado potencial, tendo em vista que a produção do bioadesivo deve basear-se na sua finalidade de utilização, para qual tipo de ferimento ele será utilizado, área do corpo, fase de cicatrização, entre outros parâmetros, pois o biomaterial desenvolvido deve ser utilizado em superfícies onde a sua tensão de ruptura seja compatível com a do tecido^{31,32}.

MOLHABILIDADE

Essa caracterização foi realizada com o intuito de analisar o grau de hidrofobicidade das amostras através do gotejamento com água destilada nas membranas, observando-se a tensão superficial entre a membrana e a gota através de um goniômetro. A verificação do ângulo de contato foi realizada através do software Angle Calculator 1.0 para determinar se o material é hidrofílico ou hidrofóbico.

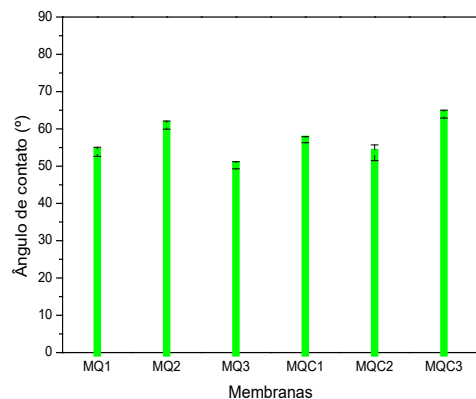
A solução G2 diminuiu a hidroflicidade das membranas de quitosana, ao mesmo tempo em que aumentou a hidroflicidade nas membranas de quitosana/colágeno. A solução G3, por sua vez,

aumentou a hidrofobicidade das membranas de quitosana/colágeno, diminuindo esse parâmetro nas membranas de quitosana, pois quanto maior o ângulo obtido, menor é a hidrofiliicidade da superfície. Entretanto, como se observa na Fig. 7, ambas as membranas apresentaram uma característica hidrofílica, com alta molhabilidade, pois os ângulos de contato foram inferiores a 90°^{33, 34, 35}.

A hidrofiliicidade da quitosana está relacionada aos grupos amina presentes ao longo de sua estrutura³⁴. Com a adição do colágeno à estrutura da quitosana, há uma interação eletrostática entre os grupos carboxílicos do colágeno com os grupos amino protonados presentes na quitosana, ocasionando uma redução na densidade da carga positiva e, conseqüentemente, o aumento do ângulo de contato^{14, 36, 37}.

Durante a reticulação das membranas, há a formação de ligações cruzadas com a cadeia polimérica principal em alta ou baixa proporção, a depender da concentração do agente reticulante, havendo um bloqueio dos grupos amino livres presentes na estrutura da membrana, ocasionando um aumento ou diminuição do ângulo de contato baseado no grau de reticulação sofrido pelo material^{34, 36}.

FIGURA 7—MOLHABILIDADE POR ÂNGULO DE CONTATO DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA E QUITOSANA/COLÁGENO

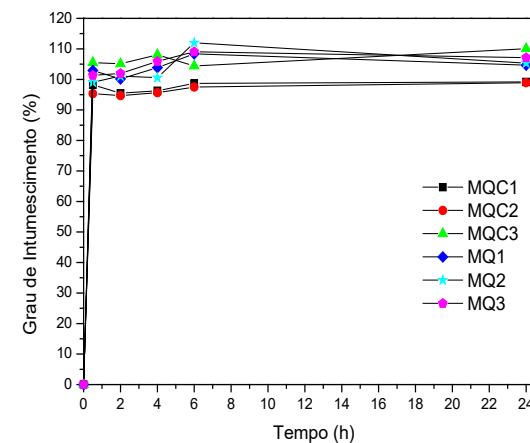


INTUMESCIMENTO

O grau de intumescimento (GI) foi determinado com o objetivo de verificar o comportamento das membranas em meio líquido semelhante ao do organismo (solução tampão fosfato – PBS).

Como apresentado na Fig. 8, as membranas MQ1, MQ2 e MQ3 apresentaram um intumescimento máximo no tempo de 6 horas, enquanto as membranas MQC1, MQC2 e MQC3 apresentaram resultado semelhante no tempo de 24 horas.

FIGURA 8—GRAU DE INTUMESCIMENTO DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA E QUITOSANA/COLÁGENO



As membranas reticuladas MQ2, MQ3 e MQC3 intumesceram mais que as membranas não reticuladas MQ1 e MQC1, resultado que diverge do exposto por Carange e Rigo³⁸ e Smaniotto e Rigo³⁹, quando afirmam que a reticulação por imersão diminui consideravelmente a capacidade de intumescimento da membrana. No entanto, MQC2 apresentou resultado compatível com o mencionado, pois intumescceu menos que MQC1. Por outro lado, resultados semelhantes foram obtidos por RIGO e HABITZREUTER⁴⁰, mostran-

do que ainda existe divergência sobre a influência da reticulação na análise do grau de intumescimento, levando em consideração a concentração dos constituintes na formação da membrana, como também o agente promotor da reticulação.

Além disso, a absorção máxima observada nas membranas foi de 111,97% (MQ2), resultado que também diverge do valor reportado por Carange e Rigo³⁸ e Smaniotto e Rigo³⁹, cujas absorções variaram de 100 até 600%.

BIODEGRADAÇÃO

A biodegradação foi realizada com o objetivo de verificar a degradação das membranas em meio biológico e foi baseada nas normas ASTM F1635-04 *Standard Test Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants*⁴¹ e a ASTM F2103-01 *Standard Guide for Characterization and Testing of Chitosan Salts as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue-Engineered Medical Products Applications*⁴².

Como é possível observar na Tabela 3, as membranas de quitosana/colágeno degradaram menos que as membranas de quitosana, tanto na solução de PBS quanto na de PBS+Lisozima, resultado que indica que a inserção do colágeno influenciou na velocidade de degradação do material. Por outro lado, nota-se que a reticulação com genipina acelerou o processo de degradação das membranas nos dois meios utilizados. Isso acontece porque o grau de reticulação das membranas possui importância no processo de degradação, uma vez que os pontos de reticulação restringem a passagem das moléculas de PBS e de lisozima para dentro de sua estrutura, dificultando ou favorecendo a degradação²⁰.

TABELA 3—BIODEGRADAÇÃO DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA E QUITOSANA/ COLÁGENO

Membranas	Perda de massa das membranas em 7 dias (%)	
	PBS	PBS + Lisozima
MQ1	4,2	2,21
MQ2	5,3	2,66
MQ3	15,16	19,37
MQC1	2,58	1,09
MQC2	3,68	1,8
MQC3	14,39	17,36

Resultados semelhantes foram obtidos por Fernandes³⁶ e Carmargo⁴³ nos seus ensaios de biodegradação para membranas de quitosana, quitosana com sulfato de condroitina e quitosana com alginato. Entretanto, os valores da degradação das membranas de quitosana/colágeno reticuladas com genipina obtidas neste trabalho foram bastante inferiores quanto aos valores reportados pelos trabalhos citados, confirmando que a interação quitosana/colágeno–genipina demonstra ser promissora para utilização na medicina regenerativa, uma vez que a velocidade de degradação provocada pela reticulação é um fator relevante para sua aplicabilidade na área médica, pois é possível controlar a duração de um sistema de liberação de fármaco no organismo através da variação deste parâmetro⁴⁴.

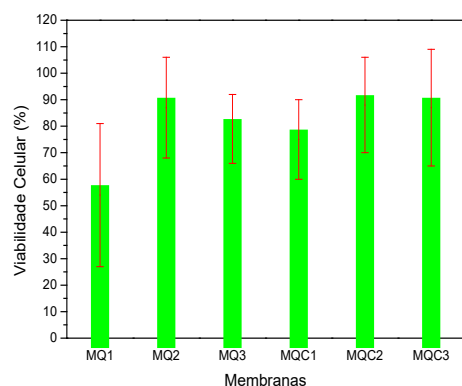
CITOTOXICIDADE

A avaliação da viabilidade celular dos fibroblastos (citotoxicidade) *in vitro* foi realizada com o intuito de observar os efeitos biológicos adversos agudos provenientes do biomaterial por meio

do teste de avaliação da viabilidade celular de fibroblastos por MTT [brometo de 3-(4,5dimetiliazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio], de acordo com a ISO 10993-5:2009⁴⁵, através do método direto de contato entre o substrato do material e as células L929.

A biocompatibilidade da quitosana e do colágeno, como também de materiais constituídos por esses polímeros já são comprovados cientificamente^{40,46,47}, contudo as membranas confeccionadas neste trabalho apresentaram efeitos citotóxicos, com exceção da MQC2, de acordo com a classificação estabelecida pela ISO 10993-5:2009, como podemos observar na Fig. 9.

FIGURA 9– VIABILIDADE DE FIBROBLASTOS L929 NAS MEMBRANAS DE QUITOSANA E QUITOSANA/COLÁGENO



As membranas de quitosana sem reticulação (MQ1) apresentaram uma viabilidade celular média de $54 \pm 27\%$ (citotóxico para a L929) que, ao analisar em conjunto com o FTIR da Fig. 2, percebe-se a ausência de bandas intensas em 1550 e 1414 cm^{-1} – alusivo ao acetato de quitosana, indicando que a neutralização com o hidróxido de amônio foi efetiva^{27,48}. Dessa forma, a citotoxicidade identificada nas membranas de quitosana confeccionadas neste

trabalho está atribuída ao processo de neutralização utilizado, uma vez que a quitosana possui um grande potencial para a adsorção de amônia^{49,50,51}.

A presença de amônia e íons de amônio na estrutura do biomaterial é responsável por uma grande porção da sua toxicidade aguda^{49,50,51}, entretanto, nota-se que a adição do colágeno à estrutura da membrana diminuiu a citotoxicidade identificada na MQ1, pois MQC1 apresentou viabilidade celular média de $75 \pm 15\%$.

A reticulação com genipina, por sua vez, também aumentou a biocompatibilidade da MQ1, uma vez que MQ2 e MQ3 apresentaram viabilidade celular próximas às exigidas pela ISO 10993-5:2009, com valores de $87 \pm 19\%$ e $79 \pm 13\%$, respectivamente.

Nas membranas de quitosana colágeno (MQC2 e MQC3), a reticulação nas condições G2 e G3 também proporcionou um aumento da biocompatibilidade do material, porém de maneira mais expressiva, pois MQC2 apresentou viabilidade celular de $88 \pm 18\%$, encaixando-se nas exigências da norma utilizada, enquanto MQC3 apresentou uma viabilidade celular de $87 \pm 22\%$.

Na análise dos resultados mencionados, alguns autores dizem que 50% é o mínimo da viabilidade celular que o biomaterial deve apresentar para não ser citotóxica, afirmativa que tornaria as membranas, com exceção da MQ1, biocompatíveis⁵².

A averiguação da biocompatibilidade de materiais com potencial aplicação médica tem início nos ensaios de citotoxicidade, cujo resultado negativo sinaliza ausência ou quantidades insuficientes de componentes prejudiciais no material avaliado, ou seja, sem potencial de estímulo de efeitos agudos em células isoladas, sob condições extremas. Um resultado positivo, ao contrário, indica a presença de uma ou mais substâncias que são extraídas e podem ter importância clínica, sendo necessárias outras investigações para a determinação da utilidade do material⁵³.

CONCLUSÕES

No processo de produção do material à base de quitosana/colágeno, evidenciou-se que houve uma incorporação do colágeno à estrutura da quitosana, influenciando diretamente no processo de reticulação.

Entre as duas soluções utilizadas para formação das ligações de entrecruzamento (G2 e G3), pôde-se constatar que o extrato alcoólico da polpa do jenipapo (G3) foi mais eficiente na atribuição de novas propriedades ao material proposto que a reticulação com genipina a 0,25% (G2). Este acontecimento pode estar associado à diferença de concentração da genipina nas duas soluções, bem como à presença de outras substâncias diluídas no extrato que possam ter contribuído positivamente neste processo.

Em meio a essas propriedades, com as análises térmicas (TGA e DSC), foi notório que a reticulação com G3 aumentou a resistência à temperatura das membranas de quitosana/colágeno, estendendo as possibilidades de esterilização dessas membranas a métodos que usam altas temperaturas, como a autoclavagem. Além disso, a presença do colágeno no biomaterial também influenciou na aquisição de novas propriedades, como a redução da velocidade de biodegradação—parâmetro inversamente proporcional ao processo de reticulação com ambas as soluções.

Por outro lado, o método para neutralização utilizado (hidróxido de amônio) provocou um encolhimento considerável nos diâmetros de todas as membranas, além de conferir caráter citotóxico ao material para a cultura de células L929. Contudo, a presença do colágeno no biomaterial e a reticulação com genipina diminuíram a sua toxicidade, tornando-o biocompatível para as finalidades propostas neste trabalho.

Baseando-se nisso, observa-se um potencial promissor na utilização do extrato bruto da polpa do jenipapo como rota al-

ternativa para a reticulação e obtenção de biomateriais de baixo custo, destinados à engenharia de tecidos como forma de tratamento e cicatrização para ferimentos de pele.

REFERÊNCIAS

1. Convenção da Biodiversidade., Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento—Rio-92. Revista Estudos Avançados. 1992;6(15):193-223.
2. Pires ALR, Bierhalz ACK, Moraes AM. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. Química Nova. 2015 Mai;38(7):957-71.
3. Landuci MC. Caracterização das propriedades mecânicas de biomateriais metálicos [dissertação]. [Bauru (SP)]: FEB/UNESP; 2016.
4. Cesconeto FR. Preparação de membranas de quitosana/poli(vinil álcool) / poli (β -hidroxibutirato) e aditivos para aplicação na engenharia de tecidos [TCC]. [Florianópolis]: CFM/UFSC; 2009.
5. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, et al. Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. 2 ed. Oxford: Elsevier Academic Press; 2013.
6. Mogoşanu GD, Grumezescu AM. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. International Journal of Pharmaceutics. 2014 Mar;463(2):127-36.

7. Bueno CZ, et al. “Aplicação de polissacarídeos para a produção de curativos e outros biomateriais”, *in*: Souza HC, Braga MEM, Sosnik, A (eds). *Biomaterias Aplicados ao Desenvolvimento de Sistemas Terapêuticos Avançados*, chapter 2. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra; 2015.
8. Oliveira RA, et al. “Síntese e caracterização de compósito quitosana com carbonato de cálcio extraído de casca de ovo para possíveis aplicações como curativo”, *in*: Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia da UEPB; 2012 Out; Campina Grande (PB), Brasil.
9. Batista JGS. Desenvolvimento de matrizes poliméricas biodegradáveis à base de quitosana e possíveis blendas como sistemas de liberação controlada de fármacos [dissertação]. [São Paulo (SP)]: IPEN/USP; 2015.
10. Laranjeira MCM, Fávere VT. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. *Química Nova*. 2009 Abr;32(3):672-8.
11. Prestes RC. Colágeno e Seus Derivados: Características e Aplicações em Produtos Cárneos. UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde. 2013;15(1):65-74.
12. Oliveira SHS, Soares MJGO, Rocha PS. Uso de cobertura com colágeno e aloe vera no tratamento de ferida isquêmica: estudo de caso. *Rev Esc Enferm USP*. 2010;44(2):346-51.
13. Moura MJC. Preparação e caracterização de hidrogéis de quitosano para administração por via injetável [tese]. [Coimbra]: CIEPQPF/UC; 2014.
14. Salazar MJC. Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana-gelatina e quitosana-colágeno visando a liberação de fármacos [dissertação]. [São Carlos]: IQSC/USP; 2015.
15. Chiono V, Pulieri E, Vozzi G, et al. Genipin-crosslinked chitosan/gelatin blends for biomedical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2008 Feb;19(2):889-98.
16. Mansnur HS, Junior ESC. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli (álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. *Química Nova*. 2008 Sep;31(6):1460-6.
17. Butler MF, Yiu-Fai NG, Pudney PDA. Mechanism and Kinetics of the Crosslinking Reaction between Biopolymers Containing Primary Amine Groups and Genipin. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*. 2003 Nov;41:3941-53.
18. Fiamingo A. Propriedades físico-químicas e mecânicas de membranas porosas de carboximetilquitosana e hidrogéis de quitosana para aplicação em engenharia de tecidos [tese]. [São Carlos]: IQSC/USP; 2016.
19. Carvalho SMS. Carboximetilquitosana/Colágeno para utilização como preenchedor cutâneo [tese]. [Campina Grande]: CCT/UFCG; 2017.
20. Tomaz AF. Desenvolvimento de membrana de quitosana/1,4 naftoquinona para liberação controlada: curativo para feridas oncológicas [tese]. [Campina Grande]: CCT/UFCG, 2017.

21. Paiva DL, et al. Introdução a espectroscopia, Tradução de Santos OS. 4 ed. CENGAGE Learning, 2010.
22. Bispo VM. Estudo do efeito da reticulação por Genipin em suportes biocompatíveis de Quitosana-PVA [tese]. [Belo Horizonte]: UFMG; 2009.
23. Cardoso MJB, et al. Ensaio Físico-Químicos e Mecânicos de Membranas de Quitosana com Cobre, Zinco e Magnésio. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*. 2012;7(1):1-6.
24. Di Martino A, et al. Chitosan-based nanocomplexes for simultaneous loading, burstreduction and controlled release of doxorubicin and 5-fluorouracil. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017 Apr;102:613-24.
25. Wade Jr LG. *Química Orgânica*. 7 ed. México: Pearson Educación; 2011.
26. Harris MI. *Pele, Estrutura, Propriedades e Envelhecimento*. São Paulo: Editora SENAC; 2009.
27. Fidèles TB, et al. Evaluation of Ionic Crosslinked Chitosan Scaffolds for Biomedical Applications. *Journal of Chitin Chitosan Science*. 2013 Dec;1(3):221-7.
28. Silva MC, et al. Avaliação do método de obtenção de scaffolds quitosana/curcumina sobre a estrutura, morfologia e propriedades térmicas. *Revista Matéria*. 2016 Mar;21(3):560-8.
29. ASTM International, D882-91. Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. Acessado em fevereiro de 2018. Disponível em: https://compass.astm.org/EDIT/html_annot.cgi?D882.
30. Albuquerque Jr RLC, et al. Effect of bovine type-I collagen-based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model. *International Journal of Morphology*. 2009;27(4):1105-10.
31. Evans ND, et al. Epithelial mechanobiology, skin wound healing, and the stem cell niche. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. 2013 Dec;28:397-409.
32. Kouchak M, Handali S, Boroujeni BN. Evaluation of the Mechanical Properties and Drug Permeability of Chitosan/Eudragit RL Composite Film. *Osong Public Health and Research Perspectives*. 2015 Feb; 6(1):14-19.
33. Yuan Y, Lee TR. Contact angle and wetting properties. In: Bracco G., Holst B. (eds). *Surface sciences techniques*, chapter 1. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2013.
34. Souza RFB. Membranas de quitosana complexada com alginato e xantana: comportamento na presença de diferentes proporções de água e incorporação de eritromicina [dissertação]. [Campinas]: FEQ/UNICAMP; 2014.
35. Raabe J, Menezzi CD, Gonçalves J. Avaliação da Superfície de Lâminas Decorativas de Curupixá (*Micropholis venulosa* Mart. Eichler). *Floresta e Ambiente*. 2016 Nov;24.

36. Fernandes LL. Produção e caracterização de membranas de quitosana e quitosana com sulfato de condroitina para aplicações biomédicas [TCC]. [Rio de Janeiro]: UFRJ; 2009.
37. Trindade LC, et al. Biofilme Gelatina/Quitosana: Preparação e Caracterização. *in*: 11º Congresso Brasileiro de Polímeros. Campos do Jordão; 2011 Out. pp. 4877-82.
38. Carange RF, Rigo ECS. Estudo do efeito do método de reticulação com glutaraldeído em membranas de gelatina/ quitosana para fins de RTG. *in*: 22º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP. São Paulo. 2014 Ago.
39. Smaniotto T, Rigo ECS. Caracterização Físico-Química de Membranas de Gelatina/Quitosana Reticuladas e Neutralizadas. *in*: 22º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP. São Paulo. 2014 Ago.
40. Rigo ECS, Habitzreuter F. Avaliação das Características Físico-Químicas e Citotóxicas de Membranas de Gelatina/ Quitosana com Hidroxiapatita Obtidas por Precipitação In Situ. *in*: 60º Congresso Brasileiro de Cerâmica. Águas de Lindóia. 2016 Mai.
41. ASTM International, F1635-04. Standard Test Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants. Acessado em fevereiro de 2018. Disponível em: https://compass.astm.org/EDIT/html_annot.cgi?D882..
42. ASTM International, F2103-01. Standard Guide for Characterization and Testing of Chitosan Salts as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue-Engineered Medical Product Applications. Acessado em fevereiro de 2018. Disponível em: https://compass.astm.org/EDIT/html_annot.cgi?D882..
43. Camargo LG. Desenvolvimento de membranas mucoadesivas compostas por diferentes proporções de quitosana e alginato para a liberação controlada do fármaco antineoplásico imiquimode [dissertação]. [Campinas]: FEQ/UNICAMP; 2009.
44. Cruz JB, et al. Síntese e caracterização de arcabouços de quitosana com agente antineoplásicos. *Revista Matéria*. 2016 Mar;21(1):129-40.
45. ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Acessado em fevereiro de 2018. Disponível em: <https://www.iso.org/standard/36406.html>.
46. Medeiros LADM, et al. Esferas de quitosana/D. ambrosioides (mastruz) para aplicação como biomaterial. *Revista Brasileira de Odontologia*; 2016 Jun;73(2):124-9.
47. Ernesto J, et al. Curativos de quitosana nanoestruturados com epicloridrina: avaliação biológica, física e físico-química". *in*: 9º Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais. Foz do Iguaçu. 2016 Ago.

48. Furtado GTFS. Quitosana/curcumina: membranas de liberação controlada para tratamento de melanoma [dissertação]. [Campina Grande]: CCT/UFMG; 2014.
49. Harada TN. Correlação entre os Ensaio de Citotoxicidade em *Artemia Salina* Leach e Atividade Antineoplásica Sobre Linhagens de Células Tumoriais Para Algumas Classes de Produtos Naturais [dissertação]. [Campo Grande]: FAMED/UFMS; 2009.
50. Takamiya AS. Avaliação da resposta tecidual e da citotoxicidade de soluções coloidais de nanopartículas de prata [tese]. [Araçatuba]: FOA/UNESP; 2013.
51. Bernardini F. Eficiência de quitinas e quitosanas na remoção de amônia total de efluentes aquícolas [dissertação]. [Palotina]: UFPR; 2016.
52. Granato AEC, et al. Avaliação da citotoxicidade de membranas de quitosana em cultura de células. *in*: XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, IX Encontro Latino Americano de Pós Graduação e III Encontro Latino Americano de Iniciação Científica Junior. São José dos Campos; 2009.
53. Bellini MZ. Desenvolvimento de membranas lamelares e porosas de xantana e quitosana para aplicação no tratamento de lesões de pele [tese]. [Campinas]: FEQ/UNICAMP; 2012.

AValiação da Influência de Quitosana na Porosidade e Resistência de Microesferas de Alginato/Quitosana para Imobilização de Microrganismos e Posterior Uso no Tratamento de Águas Residuárias

*Catarina Buson de Oliveira Muniz
Aldre Jorge Morais Barros
Valderi Duarte Leite
Maria Célia Cavalcanti de Paula e Silva*

INTRODUÇÃO

Diante da crescente geração de resíduos e consequente preocupação global sobre a questão, é notória a demanda científica mundial de desenvolvimento de tecnologias alternativas para o tratamento de efluentes visando ao reúso de águas residuárias. A biotecnologia surge no âmbito científico para auxiliar na busca por alternativas viáveis que reduzam ao máximo o impacto ambiental gerado pelo homem no meio ambiente, utilizando-se para tal dos microrganismos como ferramenta principal. Partindo desse princípio, a técnica de aprisionamento em gel vem ganhando espaço nos mais diversos segmentos industriais, mas principalmente no que diz respeito à imobilização de microrganismos em bioprocessos, como a fabricação de fármacos, a produção de enzimas, a fermentação de mostos, as reações de biotransformação e biodegradação, entre inúmeros outros¹.

O lixiviado, composto resultante da decomposição da matéria orgânica do lixo quando em contato com a água da chuva, apresenta grande potencial poluidor de corpos hídricos superficiais e

subterrâneos², o que se dá devido às elevadas concentrações de compostos orgânicos, amônia e sais inorgânicos, podendo incluir também metais pesados³, além de apresentar baixa biodegradabilidade⁴. Tais condições tornam os métodos convencionais adotados atualmente para tratar o lixiviado, principalmente lagoas de estabilização, ineficientes devido à incapacidade de os microrganismos atuarem de forma eficaz em ambientes de elevada toxicidade. O mecanismo de imobilização celular (IC) apresenta inúmeras vantagens ao ser utilizado na biorremediação desses resíduos, uma vez que conserva o metabolismo celular devido a sua maior tolerância às altas concentrações de compostos tóxicos, gerando um aumento da produtividade dos processos biológicos envolvidos⁵.

O alginato, polímero já bastante empregado na formação de esferas para tratamento de efluentes, apresenta algumas limitações, entre as quais a baixa estabilidade destes géis na presença de certos componentes, os quais podem promover rupturas e dissolução das esferas formadas, a exemplo do fosfato e do citrato. Esse problema pode ser contornado pelo tratamento com quitosana, outro biopolímero, para aumentar a resistência dos biocatalisadores formados⁵.

Uma infinidade de polímeros vem sendo estudada no intuito de aprimorar matrizes utilizadas para compor esferas imobilizadas, entre elas a quitosana. Polímero natural oriundo do exoesqueleto do inseto e da carapaça de crustáceos, a quitosana apresenta inúmeras características necessárias para obtenção de sucesso na IC, entre elas: capacidade de formar gel; baixa toxicidade; alta estabilidade; porosidade uniforme. Além disso, através de sua modificação física e/ou química, ou ainda, sua associação a outros materiais, torna-se possível obter melhorias em suas propriedades⁶.

A adição de quitosana às esferas de alginato tem como objetivo acrescentar características vantajosas na composição das microesferas para aumento da eficiência nos processos relacionados

à biorremediação. O trabalho em questão teve como finalidade avaliar a influência de diferentes concentrações de quitosana na porosidade, no intumescimento e na degradação de esferas de alginato/quitosana para sua posterior utilização nas técnicas de IC, objetivando o tratamento de efluentes.

RESÍDUOS SÓLIDOS: UM PROBLEMA AMBIENTAL

Segundo o art. 3 da Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010 (Política Nacional de Resíduos Sólidos), os resíduos sólidos se caracterizam como “*substâncias resultantes de atividades humanas em sociedade cujas características tornem inviável o seu lançamento na rede pública de esgotos ou em corpos d’água, ou exijam para isso soluções técnica ou economicamente inviáveis em face da melhor tecnologia disponível*”.

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção média *per capita* de resíduos sólidos urbanos para a população brasileira é de 0,74kg (hab.dia)⁻¹. O Ministério do Meio Ambiente garante que implicações da gestão inadequada dos resíduos sólidos no meio ambiente resultam na degradação do solo, no comprometimento de mananciais, na poluição do ar e na saúde pública⁷.

Com o objetivo de minimizar possíveis danos ao ambiente e à saúde pública, esses resíduos são destinados a aterros sanitários, locais construídos sob normas técnicas específicas, onde são confinados com segurança, conforme a NBR 8419, norma da ABNT que fixa as condições mínimas exigíveis para a apresentação de projetos de aterros sanitários de resíduos sólidos urbanos.

Resultante da decomposição da massa orgânica do lixo, o chorume, quando em contato com a água da chuva em aterros, gera o lixiviado. Resíduo com grande potencial poluidor, coloca em risco de contaminação águas superficiais e subterrâneas, o

que o torna responsável por um dos impactos mais significativos no que diz respeito à deposição de resíduos⁸. Em corpos hídricos, o acúmulo de nutrientes proveniente do lixiviado reduz a quantidade de oxigênio ali dissolvido, gerando um fenômeno conhecido como eutrofização, no qual a água adquire uma cor turva, ocasionando a morte de diversas espécies animais e vegetais.

O lixiviado caracteriza-se por apresentar, em sua composição, concentrações elevadas de compostos orgânicos, amônia e sais inorgânicos, podendo incluir também metais pesados³. Apresenta baixa biodegradabilidade⁴, sendo o tratamento biológico em lagoas de estabilização majoritariamente utilizado devido às condições climáticas favoráveis e à disponibilidade de área territorial. Esse tipo de processo pode ser considerado eficiente no primeiro instante, ou seja, no lixiviado de aterro novo, rico em ácidos graxos voláteis e elevado valor de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO). No entanto, com o passar do tempo, surgem inúmeros problemas relacionados ao lixiviado das celas mais antigas, que passa a apresentar reduzida disponibilidade de matéria orgânica biodegradável, altas concentrações de nitrogênio amoniacal, metais potencialmente tóxicos e substâncias húmicas⁹. Uma vez que se torna inviável economicamente a utilização de um único método que reduza todos os parâmetros ambientais relevantes do lixiviado, têm sido propostos métodos físico-químicos e biológicos integrados, de forma a reduzir custos e alavancar a eficiência do processo como um todo.

TRATAMENTO BIOLÓGICO DE LIXIVIADO EM LAGOAS DE ESTABILIZAÇÃO

Para o sucesso do tratamento biológico de resíduos, é necessária a presença de uma expressiva microbiota. Nas lagoas de estabilização, as bactérias heterotróficas são os principais componentes

responsáveis pela estabilização da matéria orgânica. Os protozoários alimentam-se de bactérias, algas e outros microrganismos, sendo essenciais para manutenção do equilíbrio entre os diversos organismos presentes¹⁰. Se presentes nas lagoas de estabilização, as algas servem de indicadores da fertilidade das águas, pela capacidade de sintetizar matéria orgânica e pelo rápido desenvolvimento, multiplicação e desaparecimento¹¹. No entanto, existem duas problemáticas principais relacionadas aos microrganismos no tratamento biológico em lagoas de estabilização: dificuldade no controle da população de microrganismos ali presentes e necessidade de um tempo relativamente longo para que atinjam padrões aceitáveis.

Além disso, a capacidade de degradar compostos tóxicos desses microrganismos é limitada¹². Se sujeitos a ambientes demasiadamente adversos com grandes variações de pH, temperatura ou cargas tóxicas, podem ter o metabolismo alterado, incapacitando-os assim de realizar a decomposição almejada, ou ainda, em condições extremas, levá-los à morte; e ainda, dificuldade no controle da população de microrganismos e necessidade de um tempo relativamente longo para que os efluentes atinjam o volume necessário para início dos processos de degradação¹³.

Tendo em vista que os processos convencionais de remoção por desinfecção ou diminuição da concentração de patógenos são, em partes, ineficientes, devido à toxicidade dos subprodutos gerados, alguns até mesmo carcinogênicos, a exemplo dos organoclorados¹⁴, faz-se necessário o incentivo a pesquisas que encontrem formas mais eficientes no tratamento de resíduos.

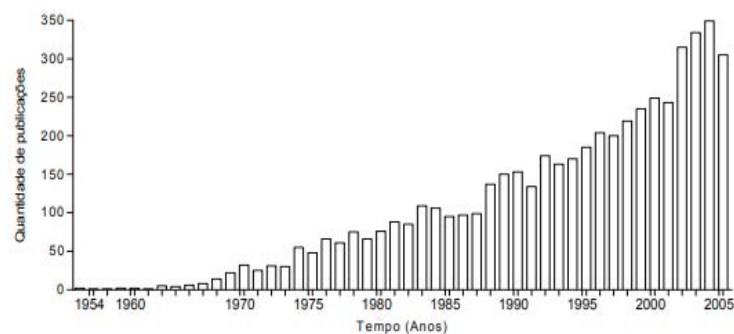
A BIOTECNOLOGIA E OS SISTEMAS IMOBILIZADOS

A utilização de microrganismos imobilizados no tratamento de resíduos traz benefícios à medida que possibilita o tratamento

de esgotos em menor área, diminuindo os custos de construção da lagoa. A imobilização de células objetiva conservar o metabolismo celular e/ou enzimático com a intenção de aumentar a produtividade dos processos biológicos envolvidos e, conseqüentemente, diminuir os custos das operações em escala laboratorial e, principalmente, industrial⁵. Dentro desse contexto, a biotecnologia surge como ciência multidisciplinar que utiliza como ferramenta os microrganismos na obtenção de produtos, geração de serviços, ou ainda, na otimização daqueles já existentes. Desde então, os processos de imobilização têm alcançado consideráveis avanços no que diz respeito à descoberta de novos materiais para matrizes, bem como ao aprimoramento das técnicas de imobilização em si. Tal afirmação pode ser elucidada conforme mostra a Fig. 1.

Imobilizar células consiste em confiná-las fisicamente em uma região definida de espaço, na qual serão mantidas suas atividades catalíticas, possibilitando a sua reutilização, além da possibilidade de se trabalhar com elevada concentração de células, o que permite um aumento considerável no rendimento de processos¹⁵.

FIGURA 1—EVOLUÇÃO DO NÚMERO DE PESQUISAS CIENTÍFICAS RELACIONADAS À IC PUBLICADAS NOS ÚLTIMOS 50 ANOS



Fonte: Web of Science Data Base “on-line”.

Uma das principais vantagens da IC é o reciclo de células, ou seja, seu reuso, principalmente se a matriz utilizada for um material inerte que apresente resistência mecânica. Tal tecnologia pode ser empregada em diversos segmentos, conforme mostra a Tabela 1.

TABELA 1—APLICAÇÕES DE MICRORGANISMOS IMOBILIZADOS E SUPORTES UTILIZADOS EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

Processo	Microrganismo	Suporte Utilizado
Produção de etanol	<i>S. cerevisiae</i>	bucha vegetal
Fermentação de mostos de uvas	<i>S. cerevisiae</i>	Maçã
Biotransformação	<i>Rhodococcus</i> sp.	Alginato
Biodegradação	<i>P. chrysosporium</i>	PUF*, cerâmica e serragem
Produção de enzimas	<i>N. frowardii</i>	PUF

*PUF: fibra de poliuretano.

Fonte: Adaptado de Covizzi (2007).

Atualmente muitas técnicas estão disponíveis para a imobilização de enzimas ou células em uma variedade de suportes naturais e sintéticos. A escolha do suporte, assim como da técnica, depende da natureza da enzima/célula, do substrato e de sua aplicação final¹⁶.

Podem-se classificar as técnicas de IC em dois grupos principais: a) naturais—relacionadas à formação de biofilmes e à adesão/adsorção microbiana em suportes sintéticos ou naturais; e b) artificiais—as quais compreendem a encapsulação em matrizes como alginato de cálcio ou uso de agentes ligantes. Nas IC naturais, as ligações ocorrem de forma espontânea por meio de interações eletrostáticas. Já nas artificiais, as células se ligam às matrizes covalentemente através de um agente ligante¹.

Diversos são os trabalhos comprovando a resistência de células imobilizadas a compostos tóxicos e ambientes hostis, fator que tem possibilitado o seu uso na biotransformação dos mais variados compostos, conforme demonstrado na Tabela 2.

O uso de biomassa imobilizada no tratamento de efluentes tem gerado diversos estudos pela sua possibilidade de aplicação na remoção de DQO (demanda química de oxigênio) em reatores anaeróbicos em batelada sequencial⁵. Nesse caso, de acordo com Ratuszne¹⁷, a IC visa melhorar a retenção de sólidos e eliminar a etapa de sedimentação, diminuindo significativamente o tempo de operação⁵.

TABELA 2—UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS IMOBILIZADAS NA BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS TÓXICOS

Composto	Microrganismo imobilizado	Matriz de imobilização
Organoclorados	<i>P. chrysosporium</i>	espuma de poliuretano
O-ftalato	<i>Bacillus sp.</i>	espuma de poliuretano
Sulfato	BRS	carvão vegetal
Hidrocarbonetos policíclicos	<i>P. chrysosporium</i>	suporte sólido
Óleo	Bactérias halotolerantes	fibras de polipropileno

Fonte: Adaptado de Silva *et al.* (2006).

No tratamento de águas residuais, o método de IC mais adotado tem sido o encapsulamento utilizando polímeros sintéticos, tendo em vista que os naturais apresentam menor estabilidade quando inseridos em ambientes com elevado grau de contaminação. Os polímeros sintéticos também apresentam maior resistência ao rompimento, porém os polímeros naturais afetam menos o metabolismo da célula imobilizada¹⁶.

Durante a escolha da matriz ou suporte a ser utilizado, é necessário levar em consideração alguns pré-requisitos que devem ser preenchidos, características fundamentais a fim de tornar o processo o mais eficaz. Algumas delas são: apresentar porosidade uniforme a fim de permitir trocas gasosas, entrada de substrato e fluxo de cofatores e produtos do metabolismo microbiano¹⁸; ter boa estabilidade mecânica, química, térmica e biológica¹⁹; ser estável a mudanças drásticas de pressão, temperatura e pH do meio²⁰; e proporcionar imobilização fácil, acessível e viável para uso em escala industrial²¹.

IC: MÉTODO DE APRISIONAMENTO EM GEL NA FORMA DE ESFERAS

O aprisionamento em gel é o método mais utilizado para imobilização de células vivas²². A imobilização celular visa preservar a atividade metabólica e/ou catalítica das células vivas ou enzimas com a intenção de aumentar a produtividade dos bioprocessos envolvidos e de diminuir os custos das operações laboratoriais e, principalmente, industriais. Uma vez que a matriz de imobilização resulta, geralmente, na maior proteção das células, encontram-se na Tabela 3 algumas vantagens do uso de células imobilizadas sobre as células livres.

Aprisionamento ou microencapsulação, como também pode ser chamado, é um método clássico que consiste no confinamento físico de células em uma matriz polimérica formadora de gel. Nessa técnica, as células microbianas são adicionadas a um material polimérico que pode ser de origem sintética como a acrilamida, o poliuretano ou o gel de álcool polivinílico (PVA-gel), ou natural, como o ágar, o alginato e a quitosana (ver Fig. 2).

De acordo com Wang *et al.*,²³ tais polímeros apresentam em sua composição cargas negativas que, quando gotejadas em solução catiônica, ocasionam a troca de íons por cátions bivalentes, tais como Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} ou Mn^{2+} , formando ligações iônicas, o que gera um gel de formato consistente e insolúvel, aprisionando assim os microrganismos.

Visto que a matriz de aprisionamento geralmente resulta em limitações no que diz respeito à transferência de massa, a imobilização na forma de esferas é preferível devido à elevada área superficial²⁵. O tamanho da esfera depende de fatores como a velocidade do fluxo, a densidade da matriz polimérica e a concentração da solução catiônica na qual a solução polimérica será gotejada.

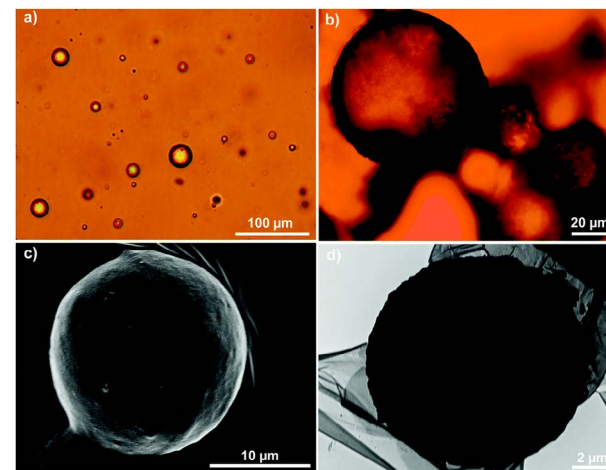
TABELA 3—VANTAGENS DO USO DE CÉLULAS IMOBILIZADAS SOBRE AS CÉLULAS LIVRES

Vantagens
Capacidade de operação na presença de uma maior densidade celular
Aumento da estabilidade e do tempo de atividade do biocatalisador
Maior afinidade pelo substrato
Maior tolerância às altas concentrações de compostos tóxicos

Fonte: COVIZZI *et al.* (2007).

A matriz formada deve permitir ao microrganismo a possibilidade de troca de gases e de massa (nutrientes, metabólitos, etc.) com o meio, mesmo que limitada. Caso a difusão de oxigênio não seja uniforme, as células da superfície do gel migram para o meio externo, ocasionando o rompimento da matriz⁵. Portanto, faz-se necessário escolher previamente o tamanho da partícula e a concentração celular a serem utilizadas no processo. A tecnologia da imobilização de microrganismos em matriz de alginato de cálcio adicionada de quitosana.

FIGURA 2—CONFINAMENTO DE QUITOSANA SOLÚVEL EM ÁGUA EM MICROESFERAS DE QUITOSANA DE TAMANHOS VARIADOS



Fonte: DANG *et al.* (2017).

Os prognósticos recentes quanto à utilização dos recursos naturais demonstram uma situação preocupante no que diz respeito à disponibilidade de água para as futuras gerações, pelo aumento do consumo aliado ao agravante da poluição doméstica e industrial. Assim, o processo de descontaminação que emprega microrganismos livres, imobilizados, ou ainda, os produtos destes, é considerado uma tecnologia ecologicamente correta e alternativa, que pode ser empregada na biorremediação²⁶.

O alginato apresenta propriedades singulares, que permitem seu uso em diferentes áreas do conhecimento²⁷. Em função de suas características físico-químicas, que permitem sua geleificação, o polímero tem sido amplamente utilizado para confinamento de microrganismos na realização de processos fermentativos, produção de fármacos, tratamento de efluentes, ou ainda, na liberação de fármacos de forma controlada. A tecnologia de IC em

alginate surgiu como uma importante ferramenta na manutenção da atividade biocatalisadora quando aplicados a biorreatores. É o polímero mais empregado em tais situações em decorrência das suas vantagens: baixo custo, baixa toxicidade e não comprometimento da fisiologia das células imobilizadas.

Polissacarídeo linear, o alginato apresenta em sua constituição química subunidades monoméricas de ácido manurônico ligado por ligações glicosídicas do tipo beta 1,4 e, também, de ácido glucurônico, unidas por ligações do tipo alfa 1,4, o que os enquadra como um heteropolímero (Fig. 2). A primeira forma de isolamento desses carboidratos se deu a partir de algas marrons pertencentes aos gêneros *Laminaria* e *Macrocystis*, sendo posteriormente também produzidos por bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Azotobacter*. A proporção de β -manurato e α -guluronato depende da origem do alginato²⁸.

Como já descrito anteriormente, a IC por aprisionamento se dá pela mistura de células microbianas com um composto polimérico de carga negativa. No caso do alginato, a formação de esferas dá início com a sua preparação com concentração que pode variar de 2 a 4%(m/v), preparado em água destilada. Para obtenção da solubilização do polímero, é necessária sua agitação por cerca de 6 horas em agitador magnético, ou 12 horas em agitador orbital em temperatura ambiente. A solução é então gotejada em uma solução iônica de concentração adequada para obtenção do gel, que deve apresentar porosidade dependente das condições previamente estabelecidas.

Dentre algumas limitações descritas para o uso da matriz de gel de alginato, destaca-se a baixa estabilidade destes géis na presença de certos componentes, os quais podem promover rupturas e a dissolução das esferas formadas, a exemplo do fosfato e do citrato. Este problema pode ser contornado pelo tratamento

com quitosana, outro biopolímero, para aumentar a resistência dos biocatalisadores⁵.

Dentro desse cenário, a quitosana surge como um polímero com elevado potencial biotecnológico aplicável às mais diversas áreas. Obtida a partir da desacetilação da quitina, geralmente resultante da hidrólise parcial dos grupos acetamida, a quitosana pode ser encontrada naturalmente na parede celular de fungos, que apresentam até 50% deste polímero na sua estrutura. Já a quitina, considerada o segundo biopolímero mais abundante na natureza, ficando atrás apenas da celulose, é encontrada atuando como elemento estrutural em artrópodes, exoesqueleto de crustáceos, e em algas diatomáceas, como também na formação da parede celular de fungos²⁹.

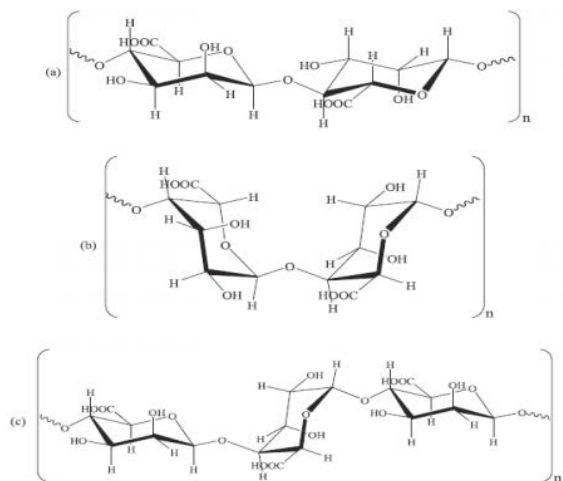
Isolada pela primeira vez em 1859, a partir do aquecimento da quitina em solução concentrada de hidróxido de potássio³¹, a quitosana (poli[β -(1-4) -2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose]) possui estrutura química molecular similar à celulose, diferindo apenas nos grupos funcionais, sendo os grupos hidroxila (OH) dispostos para a celulose e o grupamento amino (NH₂) para a quitosana³², conforme exemplificado na Fig. 4. Solubiliza-se apenas na presença de ácidos orgânicos com pH inferior a 6, sendo o ácido acético e o fórmico os mais utilizados.

Alguns fatores afetam a eficiência da desacetilação e, consequentemente, as características da quitosana obtida, tais como: a) temperatura e tempo de reação; b) concentração da solução de álcali e adição de diluente (álcoois de cadeia curta e cetonas são empregadas); c) razão quitina/álcali; d) tamanho das partículas de quitina; e) atmosfera da reação e presença de agentes que evitem a despolimerização³².

O alginato apresenta-se como um poliânion, e a quitosana é um policátion; quando dissolvidos em condições apropriadas,

ocorre a interação eletrostática dos grupos carboxílicos do alginato com os grupos amina da quitosana e o resultante entrelaçamento dos dois, formando assim a membrana que envolve os microrganismos³³. Um fator bastante atraente na quitosana é a possibilidade de modificação física e/ou química, como também sua associação com os outros materiais, buscando melhorias em suas propriedades³⁴.

FIGURA 3—COMPOSIÇÃO DO ALGINATO: (A) CADEIA DE RESÍDUOS DE ÁCIDOS MANURÔNICOS; (B) CADEIA DE RESÍDUOS DE ÁCIDOS GULURÔNICOS; (C) CADEIA DE RESÍDUOS DE ÁCIDOS MANURÔNICOS E ÁCIDOS GULURÔNICOS ALTERNADOS



Fonte: Rodrigues (2010).

O incremento da quitosana às esferas de alginato tem como objetivo adicionar suas características vantajosas na composição das microesferas. Tais propriedades são: a) porosidade uniforme da superfície ao interior, garantindo, dessa forma, uma grande difusão do substrato; b) disponibilidade de muitos grupos amina

altamente reativos, o que permite imobilizar diversas biomoléculas através de ligações covalentes; c) alta estabilidade em ambientes hostis e hidrofilicidade dos produtos formados.

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO E POROSIDADE NA DIFUSÃO DE MICROESFERAS DE ALGINATO/QUITOSANA

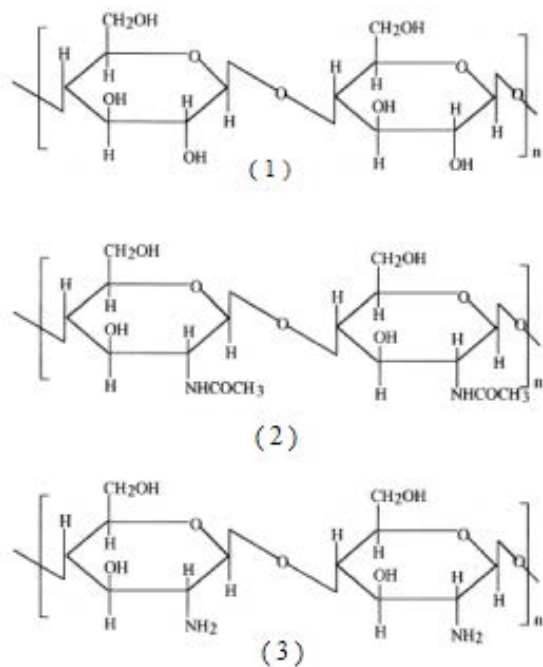
Devido à crescente utilização da quitosana na formação de matrizes, diversos parâmetros relacionados à sua presença têm sido extensamente estudados sob várias condições, como a concentração e a massa molar da quitosana, o grau de desacetilação, o pH e a temperatura no processo de geleificação³³.

Apesar das inúmeras pesquisas que vêm sendo realizadas acerca das diferentes formas de se imobilizar células, ainda não se chegou a um consenso sobre qual material ou metodologia é ideal para cada tipo de IC. Dependendo da aplicação, algumas características devem ser mensuradas quanto à escolha do suporte e ao método de imobilização, levando em consideração os seguintes aspectos: a) físicos: área superficial disponível, forma, porosidade, volume de poro, densidade; b) químicos: disponibilidade de grupos reativos e hidrofobicidade; estabilidade: estabilidade mecânica e estocagem; resistência: pH, temperatura, solventes orgânicos; c) econômicos: disponibilidade e custo da matriz e dos reagentes, equipamentos, impacto ambiental; d) reacionais: limitações difusionais, cinética da reação³⁵.

Considerando o tratamento de águas residuárias, no que diz respeito à morfologia do suporte, a porosidade é uma fator determinante para a otimização da cinética do bioprocessos, já que ela permite, ou não, o acesso das células ao meio e conseqüentemente às moléculas a serem removidas e/ou biorremediadas, a exemplo do fósforo, coliformes termotolerantes, matéria orgânica, entre

outros. Isso leva à procura por matrizes com alta porosidade, o que permite uma grande área superficial interna e poros com diâmetro suficiente para que as células realizem suas atividades bioquímicas de forma eficiente sem escapar para o meio³⁶.

FIGURA 4—COMPARAÇÃO DAS ESTRUTURAS MOLECULARES DE (1) – CELULOSE, (2) – QUITINA E (3) – QUITOSANA



Fonte: Azevedo et al. (2007).

A propriedade que um fluido apresenta de resistir à deformação por tensões cisalhantes é denominada viscosidade. É possível conferir às soluções poliméricas aumento de viscosidade com a adição de pequenas concentrações de quitosana, em meio ácido, devido a sua alta massa molecular e estrutura linear³⁷.

Conforme já explicitado anteriormente, na interação alginato/quitosana, há a junção de um polímero catiônico, o alginato, com um polímero aniônico, a quitosana. Juntos em solução aquosa, eles formam o PEC, Complexo Polieletrólítico. No caso do alginato de cálcio e da quitosana, esses compostos se ligam através de interação iônica, o que confere mais estabilidade e resistência aos dois polímeros, diminuindo os poros das microesferas³⁸.

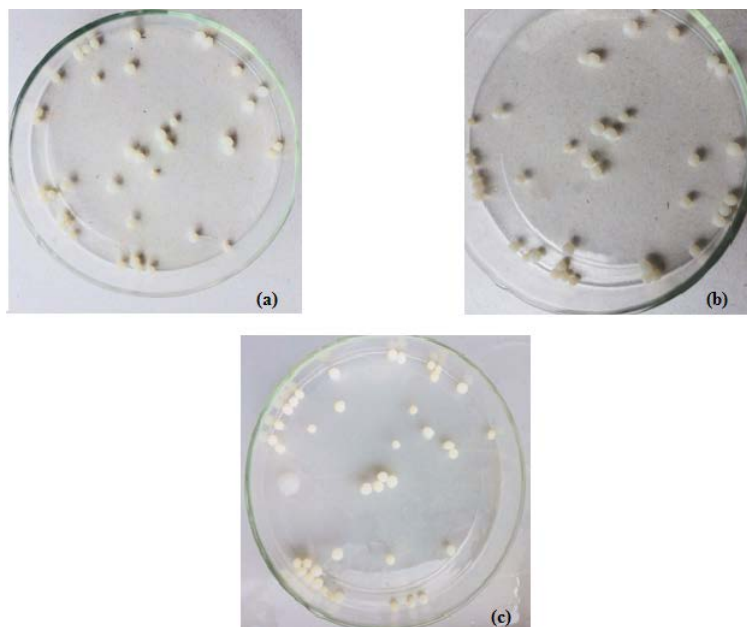
Com o auxílio de um microscópio eletrônico de varredura, já foi possível observar a morfologia dos tipos de poros encontrados na estrutura da quitosana³², no entanto, há uma carência de trabalhos científicos que relacionem concentrações de quitosana com a porosidade das microesferas. Torna-se, assim, necessário encontrar uma concentração de quitosana ideal que auxilie na estabilidade e resistência das microesferas, sem interferir na sua porosidade, contribuindo para o acontecimento das reações bioquímicas e conseqüentemente a otimização do tratamento dos resíduos.

ESTUDO DE CASO

Neste momento, iremos avaliar um estudo experimental do uso da alginato/quitosana, enfocando a influência das diferentes concentrações de quitosana na morfologia das esferas, sua caracterização e comparação com relação às esferas formadas somente por alginato. Os géis usados no experimento foram com concentrações inferiores a 3% de quitosana, já que, em concentrações superiores, pode-se observar uma maior resistência à passagem pela bomba, mostrando que o aumento da viscosidade da solução dificulta a extrusão, podendo ocasionar seu entupimento, fator determinante para se trabalhar apenas em concentrações inferiores ou iguais a tal porcentagem.

As esferas formadas apresentaram diversidade de tamanho, coloração bege e formato tendendo a esférico, demonstrado na Fig. 5. Conforme a Tabela 4, o diâmetro médio das esferas foi influenciado pelo aumento da concentração de quitosana, mostrando que as duas variáveis são inversamente proporcionais, conforme uma cresce, a outra decresce diferentemente do exposto por Tange *et al.*³⁹, que demonstrou que quanto maior a concentração total de polímero, maior o diâmetro de microesferas produzidas.

FIGURA 5—FOTOGRAFIA DE ESFERAS DE ALGINATO/QUITOSANA APÓS SECAGEM, PRODUZIDAS A UMA VAZÃO DE 15 ML/MIN COM QUITOSANA NAS SEGUINTE CONCENTRAÇÕES: (A) 1%; (B) 2% E (C) 3%



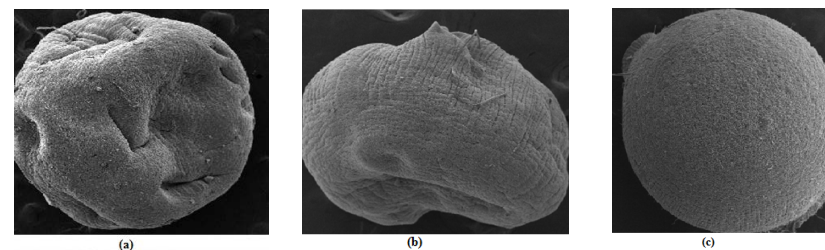
A microscopia eletrônica de varredura fornece informações sobre as características morfológicas das microesferas, como a presença de fissuras e poros, permitindo uma análise rápida e direta da eficiência da técnica de aprisionamento em gel.

TABELA 4—DIÂMETRO MÉDIO DAS ESFERAS DE ALGINATO/QUITOSANA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE QUITOSANA

Concentrações	Diâmetro Médio Esferas	Desvio Padrão
1%	3,91	±0,86
2%	3,52	±0,7
3%	3,48	±0,45

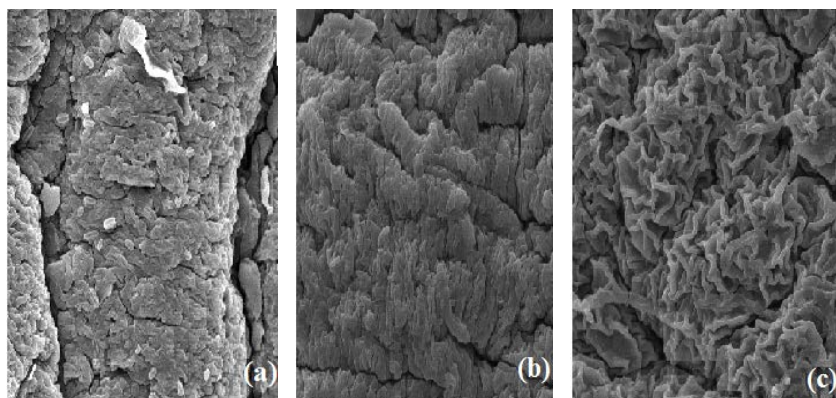
As diferentes concentrações de quitosana ocasionaram mudanças significativas na morfologia da superfície das esferas, conforme exposto na Fig. 6. As esferas (b) e (c), escolhidas aleatoriamente, apresentaram irregularidades quanto ao formato esférico se comparadas à esfera (a). Provavelmente, a maior concentração de quitosana observada em (c) favoreceu a manutenção da forma esférica, fato que se deve à força de interação iônica entre os polímeros, o que confere mais estabilidade e resistência às esferas, pois resulta na diminuição de seus poros³⁸. Além disso, a esfera (c) não apresentou deformações, o que é considerado o ideal para o tratamento de efluentes, já que o formato esférico é uma estratégia para incrementar a capacidade de adsorção da quitosana, uma vez que microesferas possuem uma área superficial cerca de 100 vezes maior do que a quitosana em flocos³².

FIGURA 6—MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS ESFERAS DE ALGINATO/QUITOSANA APÓS SECAGEM COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE QUITOSANA: (A) 1% DE QUITOSANA; (B) 2% DE QUITOSANA E (C) 3% DE QUITOSANA. AUMENTO 155 X. ESCALA 500 μM



Quanto à porosidade da superfície das esferas, elucidada na Fig. 7, uma menor concentração de quitosana mostrada em (a) resultou na obtenção de um material mais compacto e menos poroso, o que é uma característica indesejável, segundo Cunha e Beppu³⁴, já que pode comprometer a interação da matriz com o adsorbato, nesse caso das células com o efluente líquido. Em (c), é possível observar uma estrutura bastante rugosa, o que, de acordo com Silva⁴⁰, indica uma estrutura mais resistente que serve de proteção para a parte interna da esfera. Além disso, as rugosidades encontradas podem determinar um significativo aumento da área superficial para processos tanto de adsorção quanto de absorção, é tal que alguns polímeros que apresentam superfície lisa recebem tratamentos químicos na indústria para se tornarem rugosos⁴¹. Os fatos levantados corroboram a ideia de que o aumento da concentração de quitosana também é determinante não só na porosidade das esferas, mas também na formação de estruturas rugosas que aumentam sua área superficial.

FIGURA 7—MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA SUPERFÍCIE DAS ESFERAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE QUITOSANA COM AUMENTO DE 6.67 KX E ESCALA 10 μ M: A) ESFERA CONTENDO 1% DE QUITOSANA; B) 2% DE QUITOSANA E C) 3%



GRAU DE INTUMESCIMENTO (GI)

A Fig. 8 apresenta os gráficos de intumescimento em função do tempo para as esferas de alginato/quitosana em água destilada a 25°C, contendo as três diferentes concentrações de quitosana. As esferas de alginato/quitosana na proporção 4:1 (m/m) exibiram um intumescimento máximo de 80,57% no tempo de 4 horas, enquanto as esferas na proporção 2:1 (m/m) obtiveram valor máximo de intumescimento de aproximadamente 680% no tempo de 2 horas; e na proporção 4:3 (m/m), o intumescimento máximo chegou a 750% no tempo de 24 horas. Segundo Vieira *et al.*⁴², confirmaram-se que a variável com maior efeito sobre o grau de intumescimento em esferas de alginato é a concentração do polímero. Neste estudo em questão, não há variação da concentração de alginato, apenas de quitosana, de forma que todas as esferas foram submetidas às mesmas condições de preparação, secagem e imersão. Dessa forma, pode-se afirmar que o aumento da porcentagem de quitosana nas esferas de alginato está diretamente ligado à sua capacidade de absorção de água, pois quanto maior a concentração de quitosana, maior a concentração de grupos amina ainda não reticulados, ou seja, livres, formando uma estrutura menos rígida e, por conseguinte, com maior poder absorvivo.

Na Fig. 9, está sendo apresentado um significativo decréscimo na capacidade de intumescimento das esferas imersas em esgoto, em relação às submersas em água destilada, possivelmente, devido à quantidade de sólidos suspensos presentes na amostra utilizada que acabaram por bloquear alguns dos poros responsáveis pela passagem do efluente para dentro da esfera, ou ainda, pela adsorção de partículas na superfície da membrana e/ou no interior de seus poros, devido a interações entre os solutos presentes na solução a ser tratada e o material da esfera, dificultando assim o seu intumescimento⁴³.

FIGURA 8—VARIACÃO DO GRAU DE INTUMESCIMENTO COM O TEMPO PARA ESFERAS CONTENDO (A) 1%, (B) 2% E 3% DE QUITOSANA IMERSAS EM ÁGUA DESTILADA

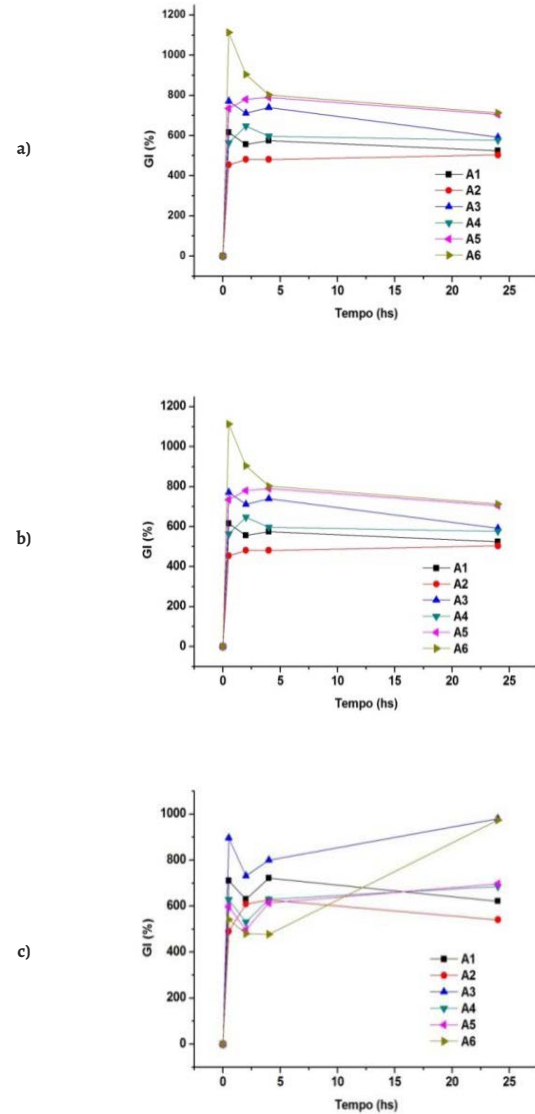
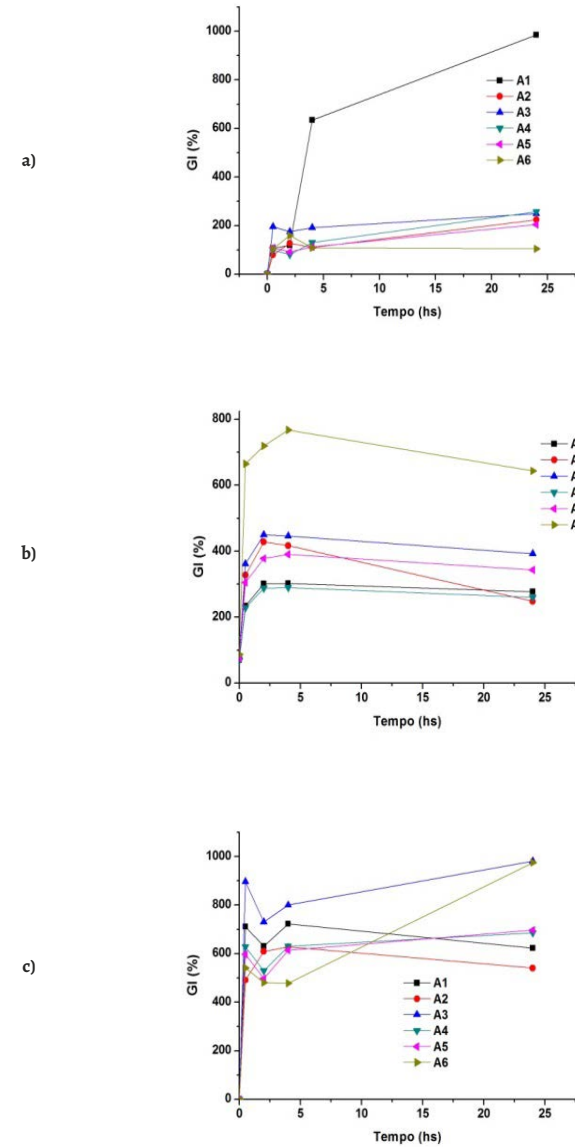


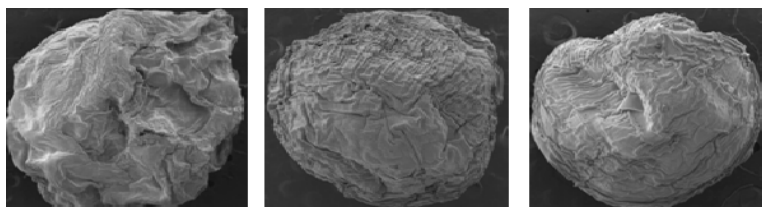
FIGURA 9—VARIACÃO DO GRAU DE INTUMESCIMENTO COM O TEMPO PARA ESFERAS CONTENDO (A) 1%, (B) 2% E (C) 3% DE QUITOSANA IMERSAS EM ESGOTO



As esferas de alginato/quitosana na proporção 4:1 apresentaram um intumescimento máximo de 341% no tempo de 24 horas, enquanto na proporção 2:1 de 435% em 4 horas, e as na proporção 4:3, 413% em 24 horas. Mesmo sob as condições geradas pelo efluente, as esferas contendo as maiores concentrações de quitosana apresentaram um maior grau de intumescimento, indicando mais uma vez que a concentração do polímero e o intumescimento são variáveis diretamente proporcionais até certo ponto. Levando em consideração apenas esse parâmetro de forma isolada, no caso de ensaios realizados com efluentes, as esferas contendo 2% de quitosana apresentaram um comportamento melhor no que diz respeito ao intumescimento por atingirem uma absorção maior em um menor período de tempo em relação às esferas contendo 3% de quitosana.

A Fig. 10 apresenta as imagens das esferas intumescidas em água destilada contendo respectivamente 1%, 2% e 3% de quitosana. É possível observar o formato irregular da esfera formada a partir da menor porcentagem de quitosana (1%), além da sua superfície densa, sem a presença de poros, enquanto as esferas com as maiores concentrações se apresentam com formato bem mais regular, tendendo à esfericidade com superfícies altamente rugosas, demonstrando que a concentração de quitosana está relacionada à manutenção da forma esférica também durante o processo de intumescimento.

FIGURA 10—MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE ESFERAS CONTENDO 1%, 2% E 3%, RESPECTIVAMENTE, INTUMESCIDAS EM ÁGUA DESTILADA



Os testes de degradação analisaram a influência da concentração de quitosana na perda de massa das esferas imersas em água destilada e esgoto no decorrer de 7 dias. Conforme os dados obtidos e trazidos na Tabela 5, as esferas a 1% quitosana tiveram um elevado percentual de biodegradação média: 50,1% para as imersas em água destilada; 63,9% para as imersas em esgoto. Já as esferas contendo uma concentração de 2% de quitosana apresentaram uma biodegradação média relativamente menor se comparadas com a amostra relatada anteriormente: 49,55% para as imersas em água destilada; 59,53% para as esferas em esgoto. As esferas a 3% quitosana apresentaram os seguintes resultados: 46,49% para as esferas em água destilada; 51,70% em esgoto.

Os ensaios mostraram que, para as maiores concentrações de quitosana, há uma menor perda de massa das esferas, tanto para o esgoto quanto para a água destilada, para um mesmo período de tempo, o que correlaciona diretamente duas novas variáveis: concentração de quitosana e biodegradação. No entanto, as esferas imersas em esgoto sofreram maior biodegradabilidade, fato que provavelmente se deve à presença de alguns minerais quelatos como cálcio, ferro, zinco e magnésio, que se ligam aos grupos amino por ligações covalentes⁴⁴. A quitosana, por apresentar muitos grupos amino, se ligou a esses minerais, possibilitando a sua desintegração e eventual perda de massa.

TABELA 4—TABELA CONTENDO OS DADOS DE BIODEGRADAÇÃO PARA AS ESFERAS COM CONCENTRAÇÃO DE 1% EM QUITOSANA, IMERSAS EM ÁGUA DESTILADA E ESGOTO, EM PORCENTAGEM, RESPECTIVAMENTE

Concentração Amostras	1%		2%		3%	
	BH ₂ O (%)	BESGOTO (%)	BH ₂ O (%)	BESGOTO (%)	BH ₂ O (%)	BESGOTO (%)
E1	28,57	50,00	68,93	89,01	34,62	14,29
E2	50,00	66,67	78,31	80,10	49,06	15,09
E3	64,00	66,67	38,24	57,14	15,00	50,70
E4	40,00	69,23	42,50	72,22	80,45	47,83
E5	60,00	58,33	38,78	25,37	41,67	94,85
E6	58,06	72,41	30,56	33,33	58,14	87,50
Média (MQC1)	50,10	63,89	49,55	59,53	46,49	51,70
Desvio Padrão	13,56	8,25	19,27	25,73	22,14	34,34

Logo, como conclusões do estudo, obtivemos as seguintes explicações:

As maiores concentrações de quitosana influenciaram no tamanho das esferas, sendo que, para maiores níveis de quitosana, o tamanho das esferas foi menor, aumentando a área superficial;

- Maiores concentrações de quitosana resultaram em superfícies mais porosas;
- Maiores concentrações de quitosana foram responsáveis pelo aparecimento de enrugamentos nas esferas, o que configura uma maior área de adsorção e/ou absorção;
- Maiores concentrações de quitosana foram responsáveis pelo maior grau de intumescimento, mostrando que as duas variáveis estão diretamente interligadas;
- A perda de massa foi menor para esferas, contendo maiores concentrações de quitosana e mostrando que essas esferas degradam menos na presença de maiores níveis do polímero.

REFERÊNCIAS

1. Covizzi LG. Seleção de um suporte sintético para imobilizar células do botryosphaeria rhodina e comparação da produção de lacase por células livres e imobilizadas [Dissertação]. [São José do Rio Preto (SP)]: Universidade Estadual de São Paulo; 2007. 86 p.
2. Kjeldsen P, Christophersen M. Composition of leach at from old landfills in Denmark. *Waste Manag. Res.* 2001; 19(3): 249-256.
3. Ganigué R, López H, Balaguer MD, Colprim J. Partial ammonium oxidation to nitrite of high ammonium content urban landfill leach, *Wat Res.* 2007; 41(15): 3317-26.
4. Lange LC, Alves JF, Amaral MCS, Júnior W de RM. Tratamento de lixiviado de aterro sanitário por processo oxidativo avançado empregando reagente de Fenton. *Eng. Sanit. Ambient.* 2006, 11(2):175-83.
5. Giese EC. Potencial biotecnológico de uso de microrganismos imobilizados em gel de alginato de cálcio Série Tecnologia Ambiental n° 81. Rio de Janeiro: CETEM/MCTI, 2015. 47 p.
6. Cunha BS. Adsorção de íons cobre em esferas porosas de quitosana na presença de líquidos iônicos [Dissertação]. [Campinas (SP)]. Universidade Estadual de Campinas; 2013. 96 p.
7. Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Cidades sustentáveis: subsídios à elaboração da Agenda 21 brasileira. Brasília: MMA, 2000.
8. Covizzi LG, Giese EC, Gomes E, Dekker RFH, Silva R. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciên. Exat. e Tecn.* 2007; 28(2): 143-60.
9. Ozturk I, Altinbas M, Koyuncu I, Arikan O, Gomec-Yangin C. Advanced physico-chemical treatment experiences on young municipal landfill leachates. 2003; 23(5):441-6.

10. Martins CL. Tratamento de lixiviado de aterro sanitário em sistema de lagoas de estabilização sob diferentes condições operacionais [Tese]. [Florianópolis (SC)]. Universidade Federal de Santa Catarina. 2010. 240f.
11. Soldatelli VF, Schawarzbald A. Comunidade fitoplanctônica em lagoas de maturação, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil. Rev. Iheringia. 2010; 65 (1): 75 – 86.
12. Buitrón G, Gonzáles A. 1996; 34(5–6): 289-94.
13. Serafim AC, Gussakov KC, Silva F, Coneglian CMR, BRITO NN, Sobrinho GD, Tonso RS. Chorume, impactos ambientais e possibilidades de tratamentos. III Fórum de Estudos Contábeis 2003. Unicamp.
14. Suassuna K. Contaminação em Paulínia por aldrin, dieldrin, edrin e outros compostos tóxicos produzidos e descartados pela Shell do Brasil S. A. São Paulo: Greenpeace. 2001. 17 p.
15. Freeman A, Lilly MD. Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. Enz. Micr. Tech. 1998; 23(5): 335-45.
16. Silva MCCC. Tratamento terciário de efluente secundário, usando a microalga *Chlorella sp.* imobilizada em matriz de alginato de cálcio [Dissertação]. [Campina Grande (PB)]. Universidade Estadual da Paraíba. 2011. 79p.
17. Ratusznei SM, Rodrigues JAD, Camargo EFM, Zaiat M, Borzani W. Feasibility of a stirred anaerobic sequencing batch reactor containing immobilized biomass for wastewater treatment. Biores. Techn. 2000; 75(2): 127-32.
18. Norton S, Watson K, D'Amore T. Ethanol tolerance of immobilized brewers' yeast cells. Appl. Microb. Biotechn. 1995; 43(1): 18-24.
19. Díaz E, Fernández A, Prieto MA, García JL. Biodegradation of aromatic compounds by *Escherichia coli*. Microb. Molec. Biol. Rev. 2001; 65(4): 523-69.
20. Moreira MT, Palma C, Feijoo O, Lema JM. Strategies for the continuous production of ligninolytic enzymes in fixed and fluidized bed bioreactors. J. Biotechn. 1998; 1(66): 27-39.
21. Fenice M, Federici F, Selbmann L, Petruccioli M. Repeated-batch production of pigments by immobilized *Monascus purpureus*. J. Biotechn. 2000; 80(3): 271-76.
22. Pradella JGC, Schmidell W, Lima UA, Aquarone E, Borzani W. Reatores com células imobilizadas. In: Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. cap. 16, 355-372 pp.
23. Wang L, Ridgway D, Gu T, Moo-Young M. Bioprocessing strategies to improve heterologous. Biotechn. Adv. 2005. 23(2): 115-29.
24. Dang NTT, Chau TTL, Duong HV, Le HT, Tran TTV, Le TQ, Vu TP, Nguyen CD, Nguyen LV, Nguyen TD. Water-soluble chitosan-derived sustainable materials: towards

- filaments, aero gels, microspheres, and plastics. *Soft Matter*. 2017. 13(40): 7292-99.
25. Groboillot A, Boadi DK, Poncelet D, Neufeld R.J. Immobilization of cells for application in the food industry. *Crit. Rev. Biotechn.* 1994; 14(2):75-107.
 26. Berger LRR. Produção e Caracterização de Quitina e Quitosana por *Rhizopus arrhizus* e *Cunninghamella elegans* e Aplicação em Membranas na Remoção de Cádmiio [Tese]. [Recife (PE)]: Universidade Federal de Pernambuco; 2013. 180p.
 27. Müller JM, Santos RL, Brigido RV. Produção de alginato por microrganismos. *Pol.* 2011. 21(4): 305-10.
 28. Rodrigues HDP. Potencial biosortivo e biodegradativo das células de “*saccharomyces cerevisiae*” livres e imobilizadas em alginato de cálcio na remoção de corantes têxteis [Dissertação]. [Rio Claro (SP)]: Universidade Estadual de Paulista. 2010. 79 p.
 29. Berger LRR. Produção e caracterização de quitina e quitosana por *Rhizopus arrhizus* e *Cunninghamella elegans* e aplicação em membranas na remoção de cádmio [Dissertação]. [Recife (PE)]: Universidade Federal de Pernambuco. 2013. 180 p.
 30. Rodrigues AP. Preparação e caracterização de membranas de quitosana e alginato para aplicação na terapia de lesões [Tese]. [Campinas (SP)]: Universidade Estadual de Campinas. 2008. 173p.
 31. Damian C, Beirão L H, Francisco A, Espírito Santo MLP, Teixeira E. Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. *Alim. Nutr.* 2005; 16(2): 195-205.
 32. Azevedo VVC, Chaves AS, Bezerra DC, Lia Fook MVM, Costa ACF. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. *Rev. Eletr. Mater. Proc.* 2007; 2(3): 27-34.
 33. Cruz MCP. Influência do poli (Etileno Glicol) (PEG) no processo de microencapsulação da oxitetraciclina no sistema alginato/quitosana: modelamento “in vitro” da liberação oral [Tese]. [Campinas (SP)]: Universidade Estadual de Campinas. 2004. 143p.
 34. Beppu MM. Infrared and microscopy study on chitosan beads containing ionic liquids in the Cu(II) uptake. In: 13° Congresso Brasileiro de Polímeros, 2015, Natal-RN.
 35. Martins RF. Estudo da imobilização de celulase em géis de quitosana [Dissertação]. [São Carlos (SP)]: Universidade Federal de São Carlos. 2007. 100p.
 36. Vieira DC. Imobilização da enzima da enzima β -galactosidase *Kluyveromyces fragiles* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação [Dissertação]. [São Carlos (SP)]: Universidade Federal de São Carlos. 2009. 96p.
 37. Bezerra AM. Síntese e avaliações físico-químicas e biológicas de derivados da quitosana de alta e baixa massa molecular [Dissertação]. [São Paulo (SP)]: Universidade de São Paulo. 2011. 72p.

38. Sousa GS. Estudo da fermentação alcoólica em um biorreator de leito fixo em sistema contínuo com células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em alginato cálcio revestido com quitosana [Dissertação]. [Campinas (SP)]: Universidade Estadual de Campinas. 2017. 142p.
39. Tang Z, Huang X, Sabour PM, Chambers JR, Wang Q. Preparation and characterization of dry powder bacteriophage K for intestinal delivery through oral administration. *LWT-Food Sc. Techn.* 2015; 60(1): 263-70.
40. Silva KMMN. Caracterização de hidrogéis semi-interpenetrantes de alginato e quitosana reticulados com cloreto de cálcio ou glutaraldeído: estudo do efeito das condições de preparo em suas propriedades mecânicas e físico-químicas [Dissertação]. [Belo Horizonte (MG)]: Universidade Federal de Minas Gerais. 2015. 136p.
41. Carneiro MP. Caracterização das propriedades de superfície de filmes de polipropileno tratados com descarga corona [Dissertação]. [Campinas (SP)]: Universidade Estadual de Campinas. 2001. 76p.
42. Vieira EFS, Cestaria AR, Chagasa RA, Cortesb GKR. Obtenção e caracterização de matriz apropriada para sistemas de liberação prolongada – estudos de liberação dos herbicidas atrazina e diuron. *Quím. Nov.* 2014; 37(3): 398-403.
43. Viana PZ. Biorreator com membrana aplicada ao tratamento de esgotos domésticos: avaliação do desempenho de módulos de membranas com circulação externa [Dissertação]. [Rio de Janeiro (RJ)]: Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2004. 162 p.
44. Oliveira RF. Morfometria computacional de órgãos de frangos de corte submetidos a duas dietas distintas: suplementação mineral quelado versus suplementação mineral tradicional [Tese]. [São Paulo (SP)]: Universidade de São Paulo. 2008. 80p.

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBIÓTICA E ANTIPROLIFERATIVA TUMORAL DAS FRAÇÕES PURÍFICAS DA URTIGA *CNIDOSCOLUS URENS*

Magna Maria Lima Araújo

Engenheira de Biotecnologia e Bioprocessos – Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido – Universidade Federal de Campina Grande
Sumé – PB – magnalima_araujo@outlook.com

Felipe Douglas Silva

Centro de Biotecnologia – Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares
São Paulo – SP – felipedouglasichigo@gmail.com

Jean César Farias de Queiroz

Unidade Acadêmica de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos, Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido – Universidade Federal de Campina Grande
Sumé – PB – queiroz@ufcg.edu.br

INTRODUÇÃO

Uso de produtos naturais, mais precisamente os de origem vegetal, é uma das práticas mais antigas usadas no tratamento e cura das enfermidades. Nesse sentido, as plantas são consideradas como um dos primeiros recursos terapêuticos utilizados pela humanidade¹.

As plantas são importantes fontes e precursoras de substâncias com grande potencial terapêutico, não apenas pela grande variedade de espécies vegetais com propriedades medicinais ainda não exploradas, mas pela grande variedade de metabólitos primários e secundários por elas sintetizadas². Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas são de natureza química e têm como função a defesa contra herbívoros, microrganismos,

proteção contra raios UV (ultravioleta), atração de polinizadores e animais dispersores de sementes, assim como produção de substâncias alopáticas, como nutrientes, dependendo das especificidades de cada planta³.

O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do planeta distribuída em toda a sua extensão territorial: cerca de 55 milhões de espécies de plantas superiores e uma farmacopeia com enorme variedade de plantas medicinais⁴. Um dos grandes desafios da ciência e da sociedade é a exploração desse patrimônio químico e biológico de forma sustentável⁵. O crescente interesse em drogas de origem vegetal é devido, entre outros fatores, à ineficiência da medicina convencional, aos efeitos colaterais de algumas drogas sintéticas e ao fator social, uma vez que grande parte da população pobre do mundo não tem acesso ao tratamento farmacológico convencional⁶.

A caatinga é um bioma com grande diversidade, sendo exclusivamente brasileiro, é constituído por um patrimônio biológico que, em muitos casos, não se encontra em outro lugar do planeta, apresenta inúmeras plantas medicinais usadas em tratamentos caseiros⁷. Entre as espécies vegetais utilizadas pela população, destaca-se a *Cnidoscolus urens* (L.) Arthur, conhecida popularmente como urtiga branca. Na medicina popular, é utilizada no tratamento de reumatismo, apendicite, inflamação na próstata, hemorragia e câncer⁸.

A *Cnidoscolus urens* (L.) Arthur é uma espécie pertencente à família *Euphorbiaceae*, gênero *Cnidoscolus*, caracterizada como um arbusto ou subarbusto, latescente, podendo atingir cerca de 0,5-2,5 m de altura⁹. A espécie é conhecida pela presença de pelos urticantes, chamados de tricomas urticantes; estes, quando entram em contato com a pele, liberam instantaneamente cristais de oxalato de cálcio, promovendo urticárias¹⁰.

Nas espécies pertencentes ao gênero *Cnidoscolus*, são evidenciados dois tipos de tricomas: urticantes e não urticantes. Os tricomas urticantes são unicelulares, com forma tubular, alongada e apresentam paredes silicosas, dispostas sobre uma base multicelular e com abertura oblíqua no ápice¹¹. Tais estruturas possuem não somente função secretora de exsudatos químicos, mas também constituem base mecânica de resistência¹². Os tricomas não urticantes são simples, unicelulares e formam indumento pubescente, velutino, tomentoso, pubérulo, viloso, revestindo a maioria das espécies nas partes vegetativas e florais¹³.

Dentro do cenário de utilização de plantas medicinais, como alternativa para o tratamento de doenças, a *Cnidoscolus urens* foi bastante relatada em levantamentos etnofarmacológicos, quanto ao seu uso pela população, como fonte alternativa de tratamento para câncer, sendo essa doença a segunda principal causa de morte no mundo¹⁴. Diante do crescente número de casos de câncer, evidenciados a cada ano em todo o mundo, torna-se necessária a busca por novas moléculas que apresentem atividade antitumoral¹⁵.

Em outras áreas, os compostos advindos de fontes naturais apresentam bastante relevância, como na área anti-infecciosa, a qual é dependente dos produtos naturais ou de suas estruturas¹⁶. Nesse sentido, as substâncias produzidas por plantas representam uma importante fonte para a descoberta de antibióticos mais eficazes.

Perante o exposto, este trabalho teve como objetivo promover a purificação dos extratos da *Cnidoscolus urens*, por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Coluna de Fase Reversa (CLEA-FR); avaliar a atividade antibacteriana e citotóxica *in vitro* das frações purificadas, com o intuito de assegurar seu uso e futuramente servir de parâmetros para o isolamento de substâncias ativas.

MATERIAIS E MÉTODOS

LOCAL DA REALIZAÇÃO DO TRABALHO

O presente experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Unidade Acadêmica de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos (UAEB), sob as seguintes coordenadas de latitude e longitude: -7.660452455692277 e -36.893180150389135, respectivamente, localizado no Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (CDSA) da Universidade Federal de Campina Grande, na cidade de Sumé-Paraíba.

MATÉRIA-PRIMA

O material vegetal foi coletado no Sítio Serra Pelada, sob as coordenadas geográficas de latitude e longitude: -7,474655, -36,839302, respectivamente, localizado a 25,9 km da cidade de Sumé-Paraíba.

TRATAMENTO DA MATÉRIA-PRIMA

O objetivo desta etapa foi promover o fracionamento da planta, com a finalidade de reduzir, mecanicamente, o material vegetal a fragmentos de pequenas dimensões, assim preparando o material para a etapa seguinte—a extração—e, conseqüentemente, o arraste dos metabólitos secundários presentes na *Cnidocolus urens*. Nessa etapa, o material vegetal foi submetido ao tratamento com etanol a 46% e fracionado em um liquidificador por 5 minutos; o processo foi repetido diversas vezes até que todo o material vegetal fosse fracionado e concentrado.

CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DA *CNIDOSCOLUS URENS*

O extrato etanólico bruto foi fracionado e centrifugado a 1580xG, por 3 minutos, em uma centrífuga (marca Logen, modelo LSDTL40B) e depois filtrado em sistema de filtração a vácuo. Após a filtração, o extrato foi distribuído em béqueres e congelado em ultrafreezer a -70°C por 48 horas. As amostras resultantes do processo acima mencionado foram liofilizadas para a obtenção do material em forma de pó.

DILUIÇÃO E FILTRAÇÃO DO MATERIAL LIOFILIZADO

O material liofilizado foi submetido ao tratamento com metanol até que todo o extrato em pó fosse solubilizado com o solvente; após a extração com o solvente, o material obtido foi filtrado, em um filtro de seringa nylon, com diâmetro de 25 mm e poro 0,20 µm, e armazenado em tubo cônico de 1,5 mL, sendo estocado em geladeira para posterior purificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Coluna de Fase Reversa (CLAE-FR).

PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS POR CLAE-FR

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Coluna de Fase Reversa (CLAE-FR) foi conduzida no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido CDSA-UFCG.

Para a purificação das amostras resultantes do extrato metanólico, foi utilizada uma Coluna PelkinElmer C18 (150mm x 4,6mm). No processo de purificação, foi programado um gradiente de água (Tampão A) e metanol (Tampão B) a um fluxo de 1mL/min. Foi mantido um volume de coluna com 100% do Tampão A,

durante 4 minutos, com um gradiente de 0 a 100% do Tampão B, durante 15 minutos, seguido de uma lavagem da coluna com 100% do Tampão B por 3 minutos.

O detector foi ajustado a um comprimento de onda de 254nm e o cromatograma gerado foi registrado e armazenado em um microcomputador interligado ao cromatógrafo. Após a avaliação dos cromatogramas gerados e o ajuste da técnica de separação, a coleta do material foi realizada manualmente, de acordo com as áreas de interesse representadas no cromatograma gerado. O material purificado foi armazenado em recipientes esterilizados e identificados de acordo com o tempo de retenção na coluna.

CONCENTRAÇÃO DAS FRAÇÕES PURIFICADAS

As amostras resultantes da etapa de purificação foram levadas ao ultrafreezer e congeladas a -70°C , por 96 horas. Após a etapa de congelamento, as amostras foram levadas ao liofilizador em uma temperatura de -90°C até que todo o líquido fosse sublimado. Em seguida, as amostras liofilizadas foram ressuspensas em água destilada, congeladas e levadas novamente ao liofilizador com a finalidade de concentrar ao máximo as amostras.

ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O teste antibiograma é utilizado para identificação de compostos com ação antimicrobiana. Para a avaliação da atividade antimicrobiana, foram utilizadas cepas bacterianas obtidas no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido CDSA – UFCG. Os extratos foram testados contra as cepas *Staphylococcus aureus* (Gram positiva) e *Escherichia coli* (Gram negativa).

MEIO DE CULTURA

O meio de cultura utilizado nos testes antibiograma foi o Ágar Mueller-Hinton, sendo este o meio de cultura microbiológico usualmente utilizado nos testes de susceptibilidade antimicrobiana.

PREPARAÇÃO DOS DISCOS

Os discos de papel foram preparados conforme descrito na Farmacopeia Brasileira¹⁷, com algumas adaptações. Os discos foram confeccionados com papel filtro e furador de papel, obtendo discos com 6mm; em cada disco, foram adicionados 20 μL do extrato obtido, aguardando a secagem e, conseqüentemente, a absorção do material; repetindo o processo novamente, sendo adicionados mais 20 μL . Os discos foram identificados como 1 (Referente à Fração 1, eluição 1-3 minutos da cromatografia), 2 (10-15 minutos) e 3 (15-20 minutos). O Disco 1 recebeu 92,96 mg; para o Disco 2, foram adicionados 93,68 mg; e o Disco 3 recebeu 93,96 mg. Com o intuito de comparar o potencial antibacteriano dos extratos obtidos, foram realizados controles positivos e negativos para cada teste. No controle positivo, foram preparados discos contendo amoxicilina 500 mg, que foi diluído em 2 mL de metanol, sendo adicionados 40 μL por disco. Desse modo, cada disco continha 10 mg de amoxicilina. O controle negativo foi realizado apenas com metanol, na mesma quantidade por disco.

PREPARO DO INÓCULO BACTERIANO

Com o auxílio de uma alça de platina, devidamente flambada, foi retirada uma pequena quantidade de bactérias e inoculada

diretamente em meio Ágar Mueller-Hinton; as placas inoculadas foram incubadas em estufa de cultura bacteriológica modelo SX-DTMC, fabricante Prolab (BOD) por 12 horas a 37°C. Após 12 horas de crescimento das culturas bacterianas, as placas foram lavadas com 1 mL de solução salina (0,9%) e armazenadas em tubo cônico de 1,5 mL, sendo esta solução, rica em bactérias, denominada solução mãe.

A partir da solução mãe, foi realizada uma diluição seriada na ordem de 10^{-7} ; todas as diluições foram inoculadas em meio Ágar Mueller-Hinton e incubadas em estufa de cultura bacteriológica modelo SX-DTMC (BOD) por 12 horas a 37°C; e as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foram contadas. A Tabela 1 representa o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) obtidas da solução inicial, quando inoculadas em meio Ágar Mueller-Hinton, para as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

TABELA 1—NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS EM UMA DILUIÇÃO DE 10^{-7} OBTIDA POR MEIO DE CULTIVO EM MEIO ÁGAR MUELLER-HINTON

CEPAS BACTERIANAS	UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFC/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i>	3,9 x 10 ⁸ UFC/mL
<i>Escherichia coli</i>	5,7 x 10 ⁸ UFC/mL

Para a obtenção de um volume de células igual a 1×10^7 UFC, a partir da solução padrão de bactérias, retiraram-se os volumes de 25 µL para a cepa de *S. aureus*, e 17 µL para *E. coli*, e foram diluídos em 975 µL e 983 µL, respectivamente.

TESTE ANTIBIOGRAMA

A partir da solução de bactérias estabelecida, foi semeado 1 mL de cada solução padrão de bactérias em placas de Petri conten-

do o meio Ágar Mueller-Hinton, aguardando secar; em seguida, foram adicionados os discos contendo o extrato sobre as placas com o auxílio de uma pinça, devidamente esterilizada. As placas foram identificadas e incubadas em BOD, a 37°C, por 12 horas. Os respectivos experimentos foram realizados em triplicata.

ENSAIO DE ATIVIDADE ANTICARCINOGENICA IN VITRO

O ensaio de citotoxicidade foi realizado no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – CNEN/SP, na Universidade de São Paulo. As linhagens utilizadas no ensaio foram as células de adenocarcinoma de próstata (LNcaP). As células foram mantidas em 10 mL de meio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil), 1g/L bicarbonato de sódio (sigma-Aldrich, Missouri, USA) e 1% de solução penicilina/estreptomicina (Gibco, Carlsbad, USA) em frasco plástico estéril para cultura de 75 cm² de área de cultura.

VIABILIDADE CELULAR

A metodologia utilizada para a avaliação da viabilidade celular foi o método colorimétrico baseado no ensaio MTS/PMS (Promega Corp, Madison, WI, EUA). Nesse ensaio, é realizada a determinação do número de células viáveis por meio da capacidade de converter o sal MTS [3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio] na presença de metanossulfonato de fenazina (PMS; Sigma, St. Louis, MO, EUA), em um composto Formazan púrpura, que é solúvel no meio de cultura. Essa conversão ocorre a partir de enzimas mitocondriais presentes apenas em células metabolicamente ativas.

ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DAS FRAÇÕES DA *C. URENS* CONTRA LNCAP

As amostras foram tratadas com a adição de 1 mL de meio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil), 1g/L bicarbonato de sódio (sigma-Aldrich, Missouri, USA) e 1% de solução penicilina/estreptomicina (Gibco, Carlsbad, USA) em cada amostra. Devido ao aparecimento de sedimentos nas Amostras 1 e 2, foi necessário, após a solubilização, realizar uma centrifugação a 10.000xG por 5 minutos. O sobrenadante foi filtrado em filtro de seringa 0,22 µm (Corning™ Syringe filters) e o volume final diminuiu de 1 mL para 600 µL.

Para realização do ensaio de citotoxicidade, as células foram tripsinizadas e semeadas em placa de 96 poços, na concentração de 5×10^3 células por poço e mantidas durante 24 horas, a 37°C, com 5% de CO₂. Após esse período, as células foram incubadas com diferentes concentrações por 48 horas. O período de incubação foi estabelecido de acordo com a metodologia usada por Monteiro¹⁸.

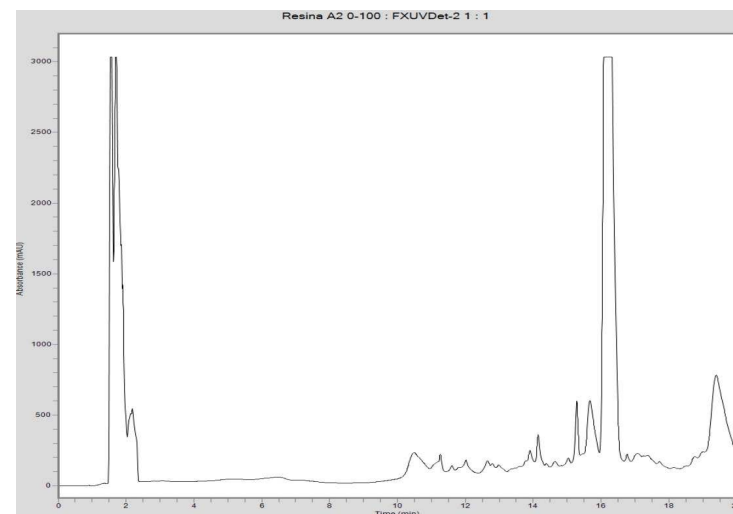
A densidade celular foi verificada por meio da adição de 20 µL/ poço de MTS (2 mg/mL em PBS) e PMS (0,92 mg/mL em PBS) na proporção de 20:1 (vol/vol). Duas horas após a adição da mistura, a placa foi lida num leitor de microplacas (Thermo Scientific Multiskan EX, Thermo Fisher, Vantaa, Finland). A quantificação de Formazan no meio foi determinada por absorbância a 490 nm. As concentrações das amostras foram testadas em triplicata e os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis, com 100% referente a células controle, sem tratamentos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

PURIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS CONTIDOS NOS EXTRATOS

O resultado do CLAE-FR, decorrente do composto obtido pela separação das frações em função do tempo do extrato da *Cnidoscopus urens*, revelou aproximadamente dezesseis picos, ou seja, a presença de cerca de 16 compostos diferentes, que podem ser responsáveis pelas atividades antibacteriana e citotóxica avaliadas nesse trabalho. A Fig. 1 mostra o cromatograma gerado a partir do processo de purificação do extrato da *Cnidoscopus urens*, com seus respectivos picos gerados em função do tempo.

FIGURA 1— CROMATOGRAMA GERADO A PARTIR DA CLAE-FR DOS EXTRATOS PROVENIENTES DA *CNIDOSCULUS URENS*



A purificação dos extratos foi realizada de acordo com o tempo de retenção na coluna. Foram testadas as áreas coletadas no período de 1 a 3 minutos, 10 a 15 minutos e 15 a 20 minutos. Todos os extratos coletados decorrentes das respectivas áreas do cromatograma gerado apresentaram atividade biológica para os ensaios realizados nesse estudo. Os compostos coletados nas áreas do cromatograma foram denominados Fração 1, Fração 2 e Fração 3.

Os extratos obtidos a partir do processo de purificação das áreas do cromatograma, mencionado anteriormente, foram testados quanto à atividade antibacteriana. Os resultados obtidos do presente estudo demonstraram que as frações purificadas conferem atividade antibacteriana, inibindo o crescimento das bactérias testes em diferentes zonas de inibição. A atividade antibacteriana foi avaliada contra as estirpes bacterianas Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativa (*Escherichia Coli*), adquiridas da coleção ATCC® 25923™ e ATCC® 25922™, respectivamente. Na Tabela 2, estão representados os halos (mm) de inibição, formados a partir da atividade antibacteriana exercida pelas frações purificadas.

Quando comparado com o antibiótico amoxicilina, os extratos metanólicos apresentaram eficiência de inibição, tanto para bactérias Gram-positivas quanto para Gram-negativas. As bactérias Gram-negativas possuem parede celular rica em lipopolissacarídeos, conferindo-lhe resistência à ação de antimicrobianos¹⁹. Bactérias Gram-positivas não possuem parede celular, sendo mais sensíveis à ação de substâncias antibacterianas, as quais provocam a destruição da membrana e decorrente coagulação²⁰⁻²².

As Frações 1 e 3 apresentaram eficiência para *S. aureus* de 76,9% e 48,0%, respectivamente, e para a espécie bacteriana de *E. coli*, a eficiência da Fração 1 foi de 32,73%; e da Fração 3, 27,2% em relação à eficiência desempenhada pelo antibiótico controle (amoxicilina) no respectivo ensaio.

TABELA 2– DIÂMETRO MÉDIO DOS HALOS DE INIBIÇÃO ANTIBACTERIANA DAS FRAÇÕES PURIFICADAS DA *CNIDOSCOLUS URENS*

TESTES	LINHAGENS BACTERIANAS	
	<i>Escherichia Coli</i> (ATCC 25922) – (mm)	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) – (mm)
Fração 1	12	13,33
Fração 2	3	6,67
Fração 3	10	8,33
Amoxicilina 10mg	36,67	17,33

De acordo com os resultados descritos na Tabela 2, observa-se que os extratos purificados apresentaram atividade antibacteriana frente às estirpes testadas, com formação de halos de inibição, tanto para *E. coli* quanto *S. aureus*. As Frações 1 (1-3 min) e 3 (15-20 min) demonstraram maior potencial antibacteriano, com formação de maiores halos de inibição. A Fração 2 (10-15 min) não apresentou atividade antibacteriana igual ou superior ao evidenciado nas Frações 1 e 3.

Sobrinho²³ avaliou a atividade antibacteriana de espécies da caatinga, a partir da medição de halos de inibição, pela técnica de poços e pela concentração inibitória mínima (CIM). Nesse estudo, foi evidenciado que o extrato etanólico da *Cnidioscolus urens* apresentou atividade antibacteriana contra as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase* negativa, na concentração de 10 mg/poço, apresentando halos de inibição de 10 mm.

Em estudos realizados por Souza²⁴, foi analisado o perfil químico e biológico do extrato etanólico bruto e de suas frações, hexânica, acetato de etila (ACEOT) e Hex/ACEOT, obtidas por partição líquido-líquido do extrato etanólico, a partir das partes aéreas da *Cnidioscolus urens*. Nesse estudo, foi identificada a presença de taninos, cumarinas, lignanas, onoterpenos, diterpenos, esteroides e flavonoides. A avaliação antibacteriana foi realizada pelo método

de microdiluição. O extrato etanólico e as frações apresentaram efeito antibacteriano para todas as cepas testadas.

O extrato etanólico bruto apresentou melhor ação bacterios-tática frente à *Serratia marcescens*, e a melhor ação bactericida foi evidenciada para as cepas *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*. Para a fração hexânica, a melhor ação bactericida foi frente às cepas de *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* e *Shigella flexneri*. A fase Hex/ACEOT apresentou a melhor ação bactericida frente ao *Bacillus ce-reus* e *Escherichia coli*.; e ACEOT apresentou melhor ação contra a cepa *Shigella flexneri*²⁴.

Bezerra²⁵ determinou o perfil fitoquímico e a atividade anti-bacteriana das espécies *Euphorbia hirta*, *E. hyssoifolia* e *E. thymi-folia*, pertencentes à família *Euphorbiaceae*. Os extratos etanólicos brutos (EH-EEB), (Ehy-EEB) e (Et-EEB) foram obtidos das partes aéreas das plantas e, posteriormente, particionados para obten-ção das frações hexânicas, clorofórmicas, acetado de etila e meta-nólicas. A triagem fitoquímica realizada para os extratos brutos e frações mostraram a presença de terpenos, esteroides e flavonoi-des. O extrato diclometânico das flores da espécie *Euphorbia hirta* foi submetido a métodos de cromatografia, sendo isoladas duas substâncias, benzoato de lupeolila e Heptacosan-1-ol. A partir do extrato das flores de *E. hirta*, foi isolada a Quercetina-3-β-Oram-nosídeo. A atividade antibacteriana foi determinada pelos méto-dos de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e de Concentração Bactericida Mínima (CBM). Os extratos etanólicos e metanólicos mostram-se ativos para as cepas bacterianas de *Enterococcus fae-calis*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, e para bactérias *E. coli* como Gram-Negativa.

Os trabalhos mencionados mostram que a atividade antibac-teriana evidenciada nos extratos da espécie *Cnidocolus urens* cor-roboros os resultados obtidos para diversas espécies pertencentes à família *Euphorbiaceae*.

ENSAIO DE CITOTOXICIDADE IN VITRO

Para avaliar o efeito citotóxico das frações purificadas da *Cnidocolus urens*, foi utilizada a linhagem LNcaP, proveniente das células de adenocarcinoma de próstata. As células foram tratadas por um período de 48 horas, com diferentes concentrações das frações purificadas da *Cnidocolus urens*, como descrito na Tabela 3, e posteriormente submetidas ao ensaio de MTS. Os experimen-tos foram analisados segundo a média ± desvio padrão da média.

De acordo com os resultados obtidos no ensaio de MTS, as Frações 1 e 3 apresentam alto efeito citotóxico sobre a linhagem testada. Entretanto, a Fração 2 não apresentou citotoxicidade so-bre as células de LNcaP.

TABELA 3—CONCENTRAÇÃO DAS FRAÇÕES PURIFICADAS DA CNIDOSCOLUS URENS UTILIZADAS NO ENSAIO DE MTS PARA CADA DILUIÇÃO

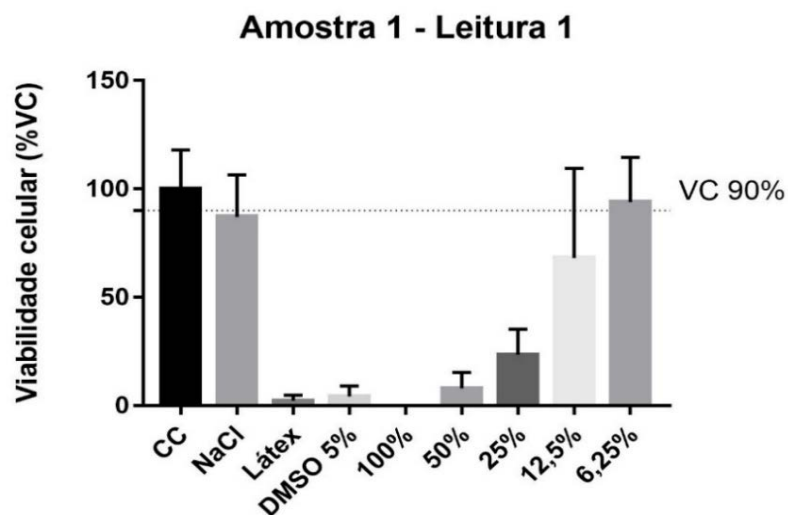
<i>Cnidocolus urens</i> (mg/mL)					
Frações	100%	50%	25%	12,5%	6,25%
1	855,9	427,9	213,9	106,9	53,5
2	805,7	402,8	201,4	100,7	50,3
3	808,3	404,1	202,1	101,0	50,5
DMSO	5%	*	*	*	*
Látex	0,2 mg/L	*	*	*	*

* = Concentração constante; %= percentagem referente diluição realizada para cada amostra. A concentração adotada para os controles no ensaio de MTS foi padrão em todas as repetições utilizadas para validar o ensaio.

A Fração 1, quando em contato com as células, apresentou alto efeito citotóxico, influenciando na viabilidade celular para três concentrações analisadas no ensaio de MTS, sendo capaz de provocar a morte de todas as células de LNcaP na concentração de 100% (855,9 mg/mL); com 50% (427,9 mg/mL) da concentração, foi

capaz de causar mortalidade de $91,9\% \pm 7,3$ das células; e com 25% (213,9 mg/mL), provocou a mortalidade de $76,5\% \pm 11,8$ das células, como mostrado na Fig. 2. O índice de viabilidade celular foi menor que 50% em três concentrações, com exceção das concentrações de 12,5% (106,9 mg/mL) e 6,5% (53,5 mg/mL), em que pode ser evidenciado alto índice de viabilidade celular, e assim as amostras nessas concentrações apresentam baixo efeito citotóxico sobre a linhagem de LNCaP.

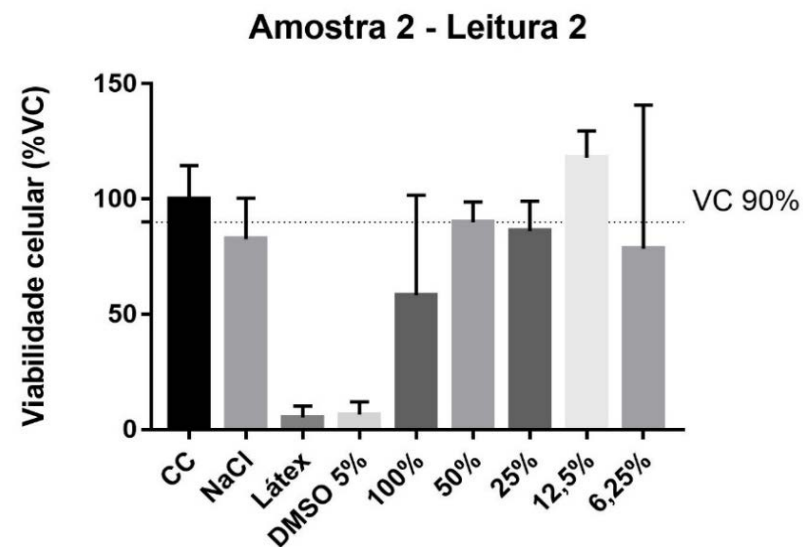
FIGURA 2—EFEITO CITOTÓXICO DA FRAÇÃO 1 DO EXTRATO DA *CNIDOSCOLUS URENS*, CONTRA A LINHAGEM DE LNCaP, APÓS 48 HORAS DE INCUBAÇÃO, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, ATRAVÉS DO ENSAIO DE MTS. OS CONTROLES SÃO REPRESENTADOS POR CC (APENAS CÉLULAS) E NaCl. A CONCENTRAÇÃO DO DMSO FOI DE 5% E PARA O LÁTEX FOI DE 0,2 MG/ML, USADOS COMO CONTROLE POSITIVO.



A Fração 2 não apresentou efeito citotóxico efetivo em nenhuma das concentrações testadas. Para todas as diluições, o índice de viabilidade celular foi maior que 50%, como representado na Fig. 3, apresentando baixo efeito citotóxico sobre a linhagem de

LNCaP. A amostra integral, ou seja, com 100% (805,7 mg/mL) da concentração, não obteve resultado estatisticamente significativo, pois seu desvio padrão foi alto. O baixo efeito citotóxico apresentado pela amostra pode ser decorrente da redução do volume, após a filtração, ou seja, os três poços não apresentavam a mesma quantidade em volume, influenciando assim o resultado final do teste para a Fração 2.

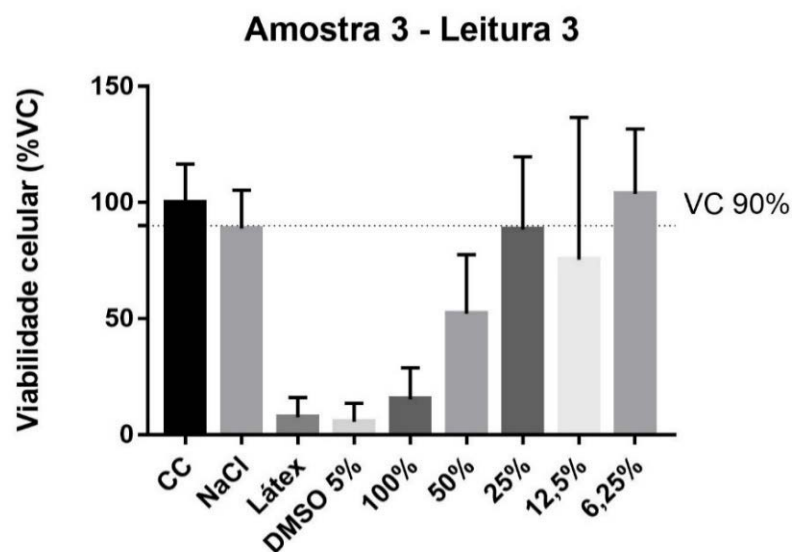
FIGURA 3—EFEITO CITOTÓXICO DA FRAÇÃO 2 DO EXTRATO DA *CNIDOSCOLUS URENS*, CONTRA A LINHAGEM DE LNCaP, APÓS 48 HORAS DE INCUBAÇÃO, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, ATRAVÉS DO ENSAIO DE MTS. O CONTROLE NEGATIVO ESTÁ REPRESENTADO POR CC (APENAS CÉLULAS) E NaCl. A CONCENTRAÇÃO DO DMSO FOI DE 5% E PARA O LÁTEX FOI DE 0,2 MG/ML, USADOS COMO CONTROLE POSITIVO.



A Fração 3 apresentou atividade citotóxica para duas concentrações com índice de viabilidade celular inferior a 50%; nas demais concentrações das amostras, o índice de viabilidade celular apresentou valor superior a 50%, demonstrando assim pouca ca-

pacidade citotóxica contra a linhagem de LNcaP. Na concentração de 100% (808,3 mg/mL) do extrato, foi evidenciada a mortalidade 86,5%±16,5 das células; e para 50% (404,1mg/mL) da concentração da fração, a mortalidade de 48,0%±25,5 das células, como demonstrado na Fig. 4.

FIGURA 4—EFEITO CITOTÓXICO DA FRAÇÃO 3 DO EXTRATO DA *CNIDOSCOLUS URENS*, CONTRA A LINHAGEM DE LNcaP, APÓS 48 HORAS DE INCUBAÇÃO, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, ATRAVÉS DO ENSAIO DE MTS. O CONTROLE NEGATIVO É REPRESENTADO POR CC (APENAS CÉLULAS) E NaCl, COMO CONTROLE POSITIVO FOI UTILIZADO DMSO E LÁTEX.



Em estudos realizados por Tavares *et al.*²⁶, foi avaliado o efeito citotóxico do extrato bruto de espécies do gênero *Cnidoscopus*. O estudo revelou que o extrato bruto da *Cnidoscopus urens* apresentou atividade citotóxica frente às linhagens Hep-2 (câncer de laringe), NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide pulmonar humano), HT-29 (adenocarcinoma de cólon humano). O potencial de inibição

para o extrato das partes aéreas da *Cnidoscopus urens* foi de 50% ± 8,3 para HT-29; a inibição contra Hep-2 foi de 88,2% ± 2,1; e de 85,3 ± 1,8 para NCI-H292.

Souza²⁷ avaliou o perfil fitoquímico e a atividade antitumoral *in vivo* dos extratos aquoso, N-butanólico, etanólico e acetato de etila, obtidos das partes aéreas da *Cnidoscopus urens*. A atividade antitumoral foi avaliada através da indução de tumores carcinoma de Ehrlich experimentais em camundongos Swiss. A avaliação dos constituintes metabólitos secundários produzidos por *Cnidoscopus urens* foi realizada através do método de cromatografia de camada delgada (CCD). Para os extratos aquoso, N- butanólico e acetato de etila, foi identificada a presença de flavonoides, açúcares reductores e terpenoides, além de cumarinas e taninos em menor quantidade. Os extratos aquosos e etanólicos foram efetivos na inibição do crescimento do tumor sólido de carcinoma de Ehrlich (84,4% e 79,2%, respectivamente), pois os animais tratados apresentaram melhora significativa nos parâmetros bioquímicos e assim melhora na resposta imunológica.

Oliveira-Junior²⁸ analisou o efeito citotóxico dos extratos e das frações obtidas das folhas e do caule de *Cnidoscopus quercifolius* (gênero *Cnidoscopus*), e de seus constituintes isolados, em células de melanoma humano (linhagemA2058). A composição química dos extratos foi determinada por análises por CG-EM (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas) e CLAE-DAD (cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjos de diodo). Foi identificada a presença de diterpenos, triterpenos e flavonoides. A fração clorofórmica apresentou o menor valor de CI50 (15,05 ± 1,04 µg/mL), na qual foi possível identificar triterpenos cinamato de lupeol, diidrocinamato de lupeol e hexanoato de lupeol, além dos diterpenos filacantona e favelanona. Entre as substâncias isoladas, filacantona e favelanona apresentam alto efeito citotóxico. O extrato clorofórmico (CHCl₃-Casca)

foi capaz de induzir a formação de corpos apoptóticos, podendo o efeito citotóxico dessa fração ser mediante a indução a apoptose.

Corrêa-Paula *et al.*²⁹, a partir do extrato hexânico do caule de *Cnidocolus phyllacanthus*, isolaram os oito compostos a seguir: 3 β -O-nanoil-lupeol, a mistura de 3- β -O-cinamoil-lupeol e 3- β -Odiidrocinamoil-lupeol, lupeol, a mistura de sitosterol e estigmasterol, deoxofavelina e favelina metil éter. As estruturas dos compostos foram determinadas por técnicas espectrais e por comparação com a literatura. Os compostos isolados foram testados quanto à atividade citotóxica contra as linhagens celulares HL-60 (leucemia promielocítica humana), NCI-H292 (carcinoma de pulmão humano) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano). O estudo revelou que o composto deoxofavelina apresentou maior atividade citotóxica, entre todos os compostos testados, com valores de CI50 variando de 2,7 a 8,9 μ g/mL.

O potencial citotóxico relevado no ensaio de MTS e os trabalhos mencionados sobre a atividade citotóxica dos constituintes isolados e investigados das espécies do pertencentes ao gênero *Cnidocolus* mostram que não só a espécie *Cnidocolus urnes*, mas o gênero *Cnidocolus* como um todo, pode ser considerada uma fonte promissora para o isolamento de compostos com ação antitumoral.

POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE UM ANTIBIÓTICO

A Fração 2 apresentou efeito antibacteriano para as classes de bactérias: Gram-positiva e Gram-negativa. Apresentou baixo efeito citotóxico celular, demonstrando seu potencial para produção de um antibiótico com ação para as duas classes de bactérias avaliadas, que não apresenta toxicidade para humanos. No perfil biotecnológico, a Fração 2 representa uma fonte promissora para

produção de um antibiótico efetivo e com menor possibilidade de provocar toxicidade, em relação às demais frações avaliadas.

As Frações 1 e 3 mostraram efetiva atividade para as duas classes de bactérias testadas, porém apresentaram alto efeito citotóxico. Devido à ausência de testes mais detalhados que determinem o índice de seletividade das frações, apenas para linhagens tumorais, as frações podem ser tóxicas para humanos.

POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DAS FRAÇÕES

As Frações 1 e 3 apresentaram alto efeito citotóxico frente à linhagem tumoral de adenocarcinoma de próstata, mostrando-se como uma fonte promissora para o isolamento de substâncias que apresentem ação antineoplásica. É necessária a realização de mais testes para determinação do potencial de seletividade dos compostos presentes nas frações, em relação a células normais, e o índice de citotoxicidade, porém não podemos descartar seu futuro promissor no que diz respeito à possibilidade de isolar substâncias com ação antitumoral.

CONCLUSÃO

O presente estudo colaborou para ampliação dos conhecimentos a respeito do potencial de isolamento de substâncias ativas advindas da espécie *Cnidocolus urens* (L.) Arthur. As Frações 1, 2 e 3 apresentaram atividade antibiótica contra *Escherichia Coli* e *Staphylococcus aureus*, mostrando-se como uma fonte promissora para o isolamento de compostos com ação atividade antibiótica. Em relação à atividade citotóxica *in vitro*, as Frações 1 e 3 apresentaram maior efeito citotóxico contra a linhagem de LNCaP nas

diferentes concentrações testadas no ensaio realizado. Porém, a Fração 2 não apresentou efeito citotóxico frente à linhagem de LN-caP utilizada no ensaio de MTS, em nenhuma das concentrações avaliadas neste ensaio.

REFERÊNCIAS

1. PAULA, C. A., CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Cnidocolus phyllacanthus*. Dissertação (Mestrado em Química)–Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2014.
2. MORAES, A. M. JUSTO, O. R.; BARRETO, G. P. M.; MERCADANTE, A. Z.; ROSA, P. T. V. Avaliação do potencial antioxidante de extratos ativos de plantas obtidos por extração com fluido supercrítico. *Quím. Nova*, v. 31, p.1699-1705, 2008.
3. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed. Porto Alegre/ Florianópolis. Ed. UFRGS/ Ed. UFCS. p. 229-615, 2010.
4. ENGELK F. Fitoterápicos e Legislação. *Jornal Brasileiro de Fitomedicina*, v.1, n.1, p. 10-15, 2003.
5. FEITOSA, P.L.R; CUNHA J.P.A., Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. *Química Nova*, 2009.
6. SILVA, Jéssica Moreira Batista. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA, ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO DA RESINA EXSUDATA DE *Albizia lebbbeck*. Monografia (Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos) – Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, Universidade Federal de Campina Grande. 2016.
7. MORAIS, N.R.L.; OLIVEIRA NETO, F.B.; MELO, A.R.; BERTINI, L.M.; SILVA, F.F.M.; ALVES, L.A. Prospecção fitoquímica e avaliação do potencial antioxidante de *Cnidocolus phyllacanthus* (müll. Arg.) Pax & k.hoffm. Oriundo de apodi – RN. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, Campinas, v.18, n.1, p.180-185, 2016.
8. ALBUQUERQUE, U. P. Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: a study in the Caatinga vegetation of NE Brazil. *Journal Ethnobiology and Ethnomedicine*, v. 2, n. 3, p. 1-10, 2006.
9. AGRA, M. F. *et al* Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.
10. SATIRO, L. N.; ROQUE, N. A família Euphorbiaceae nas caatingas arenosas do médio rio São Francisco, BA, Brasil. *Acta Bot. Bras.*, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 99-118, Mar. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102=33062008000100013-&lng=en&nrm-iso>. Acesso em: 11 dez. 2018.
11. MALHEIROS, S. G. M. Estudo Farmacobotânico de Seis Espécies de Uso Medicinal no Nordeste Brasileiro. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, PB, 2012.

12. Thurston, E.L. & Lestern, N.R. 1969. The morphology and toxicology of plant stinging hairs. **Botanical Review** **35**: 393-412.
13. DIMOCK, M.; KENNEDY, G. The role of glandular trichomes in the resistance of *L. hirsutum* f. *glabratum* to *Heliothis zea*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 44, p. 263-268, 1983
14. MELO, A. L.; SALES, M. F. O gênero *Cnidocolus* Pohl (Crotonoidea e Euphorbiaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil. *Acta bot. Bras.*, v. 22, n. 3, p. 806-827, 2008.
15. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018, 2018. Disponível em: < <http://www.who.int/cancer/PRGlobocanFinal.pdf?ua=1>>. Acesso em: 16 nov. 2018. Acesso em: 16 nov. 2018.
16. NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*. p. 629-661, 2016.
17. **Farmacopéia Brasileira**. 4 ed. São Paulo: Ind. Gráfica Siqueira, p.1-17, 1988.
18. MONTEIRO, LUANA PEREIRA. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DO EXTRATO VEGETAL DE *Croton urucurana* Baill EM LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.
19. GOULD, IM, BALAM. **New antibiotic Agents in the pipeline and how they can help overcome microbial resistance**. *Virulence*. v.4. 2013.
20. RUSSELL AD. **Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: Food additives and food and pharmaceutical preservatives**. *J Appl Bacteriol*. 1991.
21. NIKAIDO H.. et al. **Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology**. In: Neidhardt FC, editor. Washington, D.C: American Society for Microbiology Press; 1996.
22. GAO Y., et al. **The outer membrane of gram-negative bacteria inhibits antibacterial activity of brochocin-C**. *Appl Environ Microbiol*, 1999.
23. SOBRINHO, Tadeu José da Silva Peixoto. ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Cnidocolus* PRESENTES NO ECOSSISTEMA CAATINGA COM POTENCIL ATIVIDADE TERAPÊUTICA. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.
24. SOUZA, ANILSON JOSÉ DE. Estudo fitoquímico e atividade biológica in vitro de *Cnidocolus urens* L. (Arthur) (EUPHORBIACEAE). Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, 2014.
25. BEZERRA, GEÓRGIA SUELEY. ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO IN VITRO DE ESPÉCIES DO GÊNERO

- Euphorbia: *E. hirta*, *E. hyssopifolia* e *E. thymifolia* L. (EUPHORBIACEAE). Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, 2015.
26. TAVARES, E. A.; SOBRINHO, T. S. P.; CASTRO, V. T. N. A.; FILHO, J. V.; MILITÃO, G. C. G.; SILVA, T. G.; AMORIM, E. L.C. Antiproliferative activity of species of the genus *Cnidocolus* against HT-29, Hep-2 and NCI-H292 cells. *Molecular & Clinical Pharmacology*, v. 3, p.55-61, 2012.
27. SOUZA, PÂMELLA GRASIELLE VITAL DIAS DE. AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTITUMORAL DE *Cnidocolus urens* EM CAMUNDONGOS Swiss. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.
28. OLIVEIRA Jr, RAIMUNDO GONÇALVES. ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DE *Cnidocolus quercifolius* POHL (EUPHORBIACEAE) EM CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO. Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, 2017.
29. CORRÊA- PAULA, A. MELO, K. M.; da Silva, A. M.; FERREIRA, D. A.; MONTE, F. J. Q.; SANTIAGO, G. M. P.; LEMOS, T. L. G.*; BRAZ-FILHO, R.; MILITÃO, G. C. G.; da SILVA, P. B. N.; DA SILVA, T. G. Constituintes Químicos e Atividade Citotóxica de *Cnidocolus phyllacanthus*. *Revista Virtual de Química*, v.8, 2016.

ALCALOIDES DE *ERITHRINA VELUTINA* WILD: CARACTERIZAÇÃO POR CROMATOGRAFIA GASOSA E LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Natasha Lorenna Ferreira da Silva Leal

Universidade Federal do Rio Grande do Norte – Departamento de Farmácia
Natal – RN–natashalorenna@gmail.com

Yuri Manguiera do Nascimento

Universidade Federal da Paraíba – Centro de Ciências da Saúde
João Pessoa – PB–yurimanguiera@ltf.ufpb.br

Lucas Silva Abreu

Universidade Federal da Paraíba – Centro de Ciências da Saúde
João Pessoa – PB–lucas.abreu@ltf.ufpb.br

Dayse Pereira Dias Silva

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Faculdade de Farmácia
Porto Alegre – RS–daysepds@gmail.com

Josean Fechine Tavares

Universidade Federal da Paraíba – Centro de Ciências da Saúde
João Pessoa – PB–josean@ltf.ufpb.br

Alecksandra Vieira de Lacerda

Universidade Federal de Campina Grande – Centro de Desenvolvimento Sustentável do
Semiárido–Sumé – PB–alecvieira@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos vai desde a identificação da espécie vegetal, a avaliação, a análise das atividades farmacológicas, toxicológicas, microbiológicas e biológicas, a determinação de critérios de qualidade até chegar a sua produção farmacêutica em maiores escalas.¹

No Brasil, esse tipo de medicamento tem ampla importância na economia; do ponto de vista cultural, o país tem uma estimativa de mais de 22% das espécies vegetais do planeta² e, em função da grande diversidade, o potencial exploratório do país para obtenção de medicamentos à base de produtos naturais vegetais é bastante elevada. A medicina popular já confirma esse direcionamento tendo em vista a grande utilização de espécies vegetais na cultura popular com eficiência considerável em seus resultados.³

As plantas são uma importante fonte de substâncias biologicamente ativas, pois apresentam constituintes químicos conhecidos como metabólitos, que exercem atividades sobre o metabolismo de outros organismos,⁴ podendo ser primários ou secundários. Metabólitos primários são descritos como compostos necessariamente ligados à sobrevivência da planta, como, por exemplo, DNA, RNA, açúcares, proteínas e aminoácidos⁵; os metabólitos secundários são importantes com relação à sobrevivência e propagação das plantas, tanto pela defesa contra herbívoros ou competidores e patógenos como pela proteção à radiação solar; ou ainda como fator de contribuição para a dispersão de pólen e sementes.⁶ Muitas vezes, as substâncias sintetizadas em um ou vários órgãos da planta podem atuar como fitoterápicos, ou seja, expressar potencialidades terapêuticas.

Apesar dos avanços e da instigação à pesquisa com medicamentos oriundos de produtos naturais vegetais, ainda existem diversas dificuldades com relação à matéria-prima de origem, pois muitas espécies utilizadas como fitoterápico, direta ou indiretamente, ainda não possuem dados oficiais que comprovem a sua autenticidade; muitas vezes, inúmeras espécies são confundidas ou adulteradas pelo fato de, em regiões distintas, serem denominadas e conhecidas de formas diferentes, ou seja, falta padronização.³ O comércio de plantas nativas medicinais encontradas em feiras livres e mercados também apresenta riscos aos

consumidores no que diz respeito à comprovação da toxicidade e seus reais efeitos farmacológicos.⁷ O aumento no consumo de diferentes produtos à base de plantas medicinais e fatores como a precariedade na fiscalização da produção e da venda têm comprometido a qualidade desses itens.⁸

Neste cenário, a caatinga ganha protagonismo tendo em vista que é o principal ecossistema existente na região Nordeste, estendendo-se pelo domínio de climas semiáridos, que compreende os estados do Ceará, mais da metade da Bahia, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Rio Grande do Norte, quase metade de Alagoas e Sergipe, além de pequenas áreas de Minas Gerais e do Maranhão, com um bioma caracterizado por grande variedade de paisagens, riqueza biológica e endemismo.⁹ Esse bioma possui espécies que apresentam adaptações à deficiência hídrica e a elevadas temperaturas, entretanto existem poucos estudos sobre o potencial biotecnológico de microrganismos dessa região de condições extremas, havendo a hipótese de que os microrganismos também desenvolvem mecanismos de adaptação para sobrevivência às condições adversas, assim como as plantas dessa região.¹⁰

Vistas a diversidade de formações fisionômicas e a vasta concentração de espécies endêmicas encontradas nesse bioma, são de grande valia estudos, ações e planos de manejo que sejam implementados para garantir a existência de espécies ainda não estudadas e que apresentam potencial elevado para diversas pesquisas e fins. Vale salientar que o uso e a potencialidade da vegetação são bastante variados, dependendo da região onde ocorrem.

Entre as espécies com grande potencial para produção de drogas de origem vegetal existentes na caatinga, destacam-se as plantas do gênero *Erythrina*, as quais são extensivamente conhecidas pelo seu potencial farmacológico com base na cultura popular, que a utiliza para diversos fins medicinais desde muito tempo.¹¹ O gênero *Erythrina*, por pertencer à família *Leguminosae*,

é bastante notado devido à produção de alcaloides, flavonoides, pterocarpanos, cumarinas, isoflavonoides, triterpenos e esteroides, que apresentam uma elevada utilidade farmacológica, sendo as principais fontes de alcaloides tetracíclicos. Informações botânicas, como aspectos morfológicos e anatômicos, são de extrema importância na caracterização de espécies do gênero *Erythrina*, vista a semelhança destas e a denominação popular, que apresenta variação de acordo com a região de origem, cultura ou uso, podendo ocasionar equívocos que comprometam estudos e/ou produção de drogas vegetais.⁶ *Erythrina verna* apresenta mesma indicação popular e grande semelhança com a *E. velutina*, porém ocorre em diferentes regiões brasileiras. A *E. verna* está presente na Relação Nacional de Plantas de Interesse do SUS (RENISUS) e é empregada em associação a outros gêneros durante a produção de três medicamentos fitoterápicos ansiolíticos pela indústria brasileira. São eles: Maracugina Composta® (Hypermarcas), Calmapax® (Delta) e Passaneuro® (Bunker). Os fitoterápicos hipnóticos sedativos representam 63,73% das vendas totais de medicamentos fitoterápicos no Brasil, dos quais 21,67% são os medicamentos acima citados.³

O gênero *Erythrina* também apresenta aspectos toxicológicos. Ocorre a presença de lectinas que levam a gastroenterites, diarreias e náuseas. Alguns aminoácidos que ocorrem livremente em leguminosas também trazem efeitos tóxicos a seres humanos, estando concentrados nas sementes, mas podendo ocorrer em toda a planta,¹² o que causa a limitação desse tipo de vegetal no uso como alimento. Dessas substâncias tóxicas, as mais relevantes são os compostos latirogênicos, que estão presentes em sementes de algumas espécies de *Leguminosae*, os quais acarretam condições patológicas (latirismo) que podem ocorrer de três formas diferentes: neurolatirismo (paralisia de membros inferiores, fraqueza, dificuldades respiratórias e tremores dos músculos), angiolatirismo (ruptura da aorta) e osteolatirismo (caracterizado por deformações esqueléticas que são relacionadas a desordens

no crescimento em ossos e cartilagens, devido ao distúrbio na síntese de compostos elásticos em tecidos mesenquimais e no sistema esquelético).¹³

Fatores anutricionais como inibidores de proteases e inibidores de tripsina também se fazem presentes no gênero *Erythrina*, sendo a principal causa de animais em experimentos alimentados com ração crua. Homólogos do inibidor de tripsina da soja foram isolados em sementes de eritrinas. Estes compostos são capazes de causar depressão no crescimento de animais em estudo; reduzir a absorção de enxofre e nitrogênio, quando utilizado em rações cruas; interferir na digestibilidade de proteínas de soja em roedores; impulsionar hiperplasia e hipertrofia do pâncreas (excessiva secreção de enzimas); bem como impulsionar a síntese de tripsina e quimiotripsina no pâncreas, aumentando a demanda de metionina e cisteína.¹²

Erythrina cristgalli é considerada tóxica devido à presença de alcaloides pela via administração parenteral, podendo levar a um quadro neurológico de astenia, paresia ou paralisia muscular. Essa paralisia é resposta dos alcaloides sobre a acetilcolina, obedecendo à sequência seguinte: músculos enervados pelos nervos cranianos, músculos do tronco e das extremidades e musculatura respiratória.⁴ Porém quando os alcaloides de *Erythrina cristgalli* são absorvidos pelo tubo gastrointestinal, são excretados pelos rins de maneira rápida, de modo que, por essa via, não ocorre intoxicação.¹²

O Nordeste é uma área onde são encontradas árvores da espécie *E. velutina*. Por ser uma área de escassez hídrica e temperaturas elevadas, os organismos que habitam nesta região apresentam potencial excepcional de sobrevivência a adversidades climáticas, favorecendo a investigação e o estudo de espécies e metabólitos que estes produzem, gerando um grande interesse para a descoberta de novas substâncias com atividade farmacológica.

A espécie *E. velutina* Willd (Fig. 1) se apresenta botanicamente com porte arbóreo, aculeada ou espinhenta; normalmente apre-

senta de 10-15m de altura e 80cm de DAP (diâmetro à altura do peito, medido a 1,30m do solo) na idade adulta; tronco reto, levemente tortuoso, apresenta ramificação dicotômica com copa aberta e arredondada; tem comportamento decídua, heliófila, ramos e troncos de 40-70cm de diâmetro; a casca mede até 25 mm de espessura; folhas compostas trifolioladas, flores vermelhas ou laranjas ocorrem em fascículos axilares, medindo de 12 a 20cm de comprimento e com três flores; fruto tipo legume um tanto curvo, de ápices e bases agudas, internamente não septado, com 1 a 3 sementes de coloração vermelha, que tem sua dispersão anemocórica (pelo vento) e zoocórica (por animais); plântulas do tipo fanerocotiledonar-epigeal-de-reserva.^{14,15}

FIGURA 1 - ERYTHRINA VELUTINA WILLD



Fonte: APNE/CNIP

Presente na América Central e do Sul, no Brasil do Nordeste até Minas Gerais, possui ampla ocorrência em áreas semiáridas e secas,⁸ ocorrendo de forma natural nos seguintes estados: Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Sergipe e Piauí. *E. velutina* é a única espécie do gênero *Erythrina* que está presente no bioma Caatinga.¹⁶

A etimologia do nome científico *E. velutina* tem origem do grego *erythros*, devido a sua coloração avermelhada das inflorescências, e *velutina*, do latim, devido à textura aveludada para o epíteto específico oriundo dos indumentos delicados e pelos macios das folhas. O nome vulgar, mulungu, tem origem africana e apresenta como significado pandeiro. Acredita-se que se deve ao som produzido pela batida do seu tronco oco.¹⁴ Popularmente denominada suína, mulungu, canivete, corticeira, eritrina-mulungu e bico-de-papagaio,¹⁷ apresenta sinonímia botânica com *Chirocalyx velutinus* Walp., *Corallodendron velutinum* (willd.) Kuntze, *Erythrina aculeatissima* Desf., *Erythrina splendida* Diels.

Na medicina popular, a *E. velutina* tem destaque pelo uso de suas folhas, cascas e frutos. A infusão das cascas é utilizada como calmante natural sedativo, indicada para problemas no sistema nervoso, como depressão, ansiedade, insônia, epilepsia, estresse,¹⁸ tosse, bronquite, tratamento de verminoses e hemorroidas;¹⁴ também possui efeito hipotônico, além de estabilizar altos níveis de enzimas do fígado. O efeito calmante da planta pode ser benéfico a pessoas que sofrem pela abstinência de nicotina ou drogas,¹⁷ bem como a decoção das cascas é usada para precipitar a maturação de abscessos gengivais,¹⁹ embora a eficácia e a segurança de seu uso ainda não tenham sido confirmadas cientificamente.¹⁷ As folhas são utilizadas em infusões ou através de decoção como tranquilizantes, também são indicadas no tratamento de sonolência e convulsões.¹⁸ Ao fruto seco, é atribuída a capacidade de ação anestésica local, sendo utilizada na forma de cigarro.¹⁹

Estudos farmacológicos realizados em animais mostram que o extrato de *E. velutina* apresenta atividades espasmolítica, curarizante, antimuscarínica e depressora do sistema nervoso central, de modo que ocorre compatibilidade com a utilização na medicina popular.¹⁷ Os extratos hidroalcoólicos das cascas do caule de *E. velutina* e *E. mulungu* apresentaram atividade anticonvulsivante

como resposta a um aumento considerável na latência da convulsão no modelo induzido por estriquina, sendo *E. velutina* mais potente que *E. mulungu* neste aspecto.²⁰

O extrato aquoso das folhas de *E. velutina* ampliou o tempo de sono induzido pelo pentobarbital, não havendo distinção entre as doses utilizadas, de maneira dose-dependente, levando a um efeito sedativo e hipnótico, porém doses elevadas reduziram a atividade motora no campo aberto.²¹ Esses resultados, em geral, são análogos ao Diazepam, que, em doses baixas, atua como ansiolítico; e em doses mais elevadas, age como relaxante muscular e sedativo. Na avaliação do alcaloide hipaporfina, proveniente de *E. velutina*, diante de atividade indutora do sono, foi evidenciado que este alcaloide aumentou significativamente os movimentos oculares não rápidos (NREM) na primeira hora de tempo de sono após a sua administração. O tempo de sono foi aumentado em 33% em camundongos experimentais em comparação com o do controle.²² Este estudo confirmou a propriedade que esta espécie vegetal tem na promoção do sono.

No teste de formalina, caracterizado por duas fases, em que a primeira é resultado da atividade química direta de fibras aferentes nociceptivas, mielinizadas ou não; e a segunda é resultado de mudanças de longa duração provocadas por estímulos danosos nos neurônios do colo dorsal da medula, foi possível constatar que a inibição foi superior na segunda fase (resposta inflamatória). Portanto os autores sugeriram que o extrato pode produzir uma atuação modulatória no nível do SNC, que por sua vez possui efeitos antinociceptivos.¹⁸ *E. velutina* apresentou atividade anestésica no extrato aquoso das folhas, em que foi demonstrado efeito analgésico, cuja eficácia foi correspondente à morfina em um dos modelos de indução de dor.²³ Santos *et al.* (2007) demonstraram a ação relaxante em ducto deferente de ratos do extrato aquoso de folhas de *E. velutina*.

Das sementes de *E. velutina*, foi extraída uma lectina que incentivou a migração de neutrófilos no peritônio e bolsa de ar dorsal em ratos, levando à possibilidade de desenvolvimento de medicamentos anti-inflamatórios com base na estrutura de lectinas desse tipo.¹² Também das sementes foram extraídos vários alcaloides, como hipaforina, um alcaloide indólico,²² além de eritralina, 8-oxoeritralina, erisotrina, erisodina, erisovina e glicoesodina.²⁵ De *E. velutina*, foram isolados os alcaloides (+)-eritralina e a (+)-eritratina;²⁶ e a avaliação da composição química das cascas de *E. velutina* apresentou os flavonoides faseolidina e homoesperetina, sendo que a última ainda não havia sido relatada para espécies de *Leguminosae*²⁷, como também a erivelutinona e a 3'-O- etilsigmoidina.²⁸

Sendo assim, fica demonstrado que o interesse farmacológico dos pesquisadores pela *E. velutina* não é em vão, pois esta já é muito utilizada e apresenta resultados benéficos e eficazes na medicina popular. Com este embasamento da cultura popular, a ciência alia suas tecnologias para que novos fármacos sejam desenvolvidos a partir da utilização dessa matéria-prima rica e abundante em nossa região. Com bases nos estudos acima citados, pode-se considerar a *E. velutina* como uma espécie vegetal que tem relevância farmacológica, visto que é provável seu efeito tanto sobre a ansiedade quanto sobre a dor, o que impulsiona a necessidade de estudos de investigação química com a finalidade de compreender melhor o papel de seus constituintes químicos nas respostas farmacológicas obtidas.

O estudo dos componentes químicos vegetais denomina-se fitoquímica. Com auxílio da purificação por métodos cromatográficos e da identificação por técnicas espectrais, tais como ressonância magnética nuclear (RMN), infravermelho (IV), espectrometria de massas (EM) e espectroscopia nas regiões do ultravioleta (UV), juntamente com técnicas como cromatografia em fase ga-

sosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), bem como acoplamento da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com EM e RMN, facilita a melhoria e a otimização das análises, visto que as informações e os resultados obtidos sobre a estrutura dos componentes da matriz vegetal são altamente confiáveis.³ Para isso, a utilização de técnicas hífenadas é de grande valia, pois fornece numerosas informações estruturais dos metabólitos antes mesmo do seu isolamento.

Diante da necessidade de um aprofundamento da investigação química motivado pelas poucas informações na literatura especializada sobre a presença, interferência ou alterações das características químicas, principalmente *in natura*, das plantas medicinais comumente utilizadas, este trabalho tem como objetivo geral caracterizar alcaloides das cascas do caule de *E. velutina* Willd (*Fabaceae*) por cromatografia líquida e gasosa, acoplada à espectrometria de massas através do desenvolvimento de metodologias de extração dos alcaloides, de métodos analíticos para cromatografia gasosa e líquida; e propor mecanismos de fragmentações para os alcaloides identificados por espectrometria de massas e, desta forma, facilitar novas perspectivas para interesses farmacológicos/biotecnológicos.

METODOLOGIA

COLETA E DESINFESTAÇÃO DAS CASCAS DO CAULE

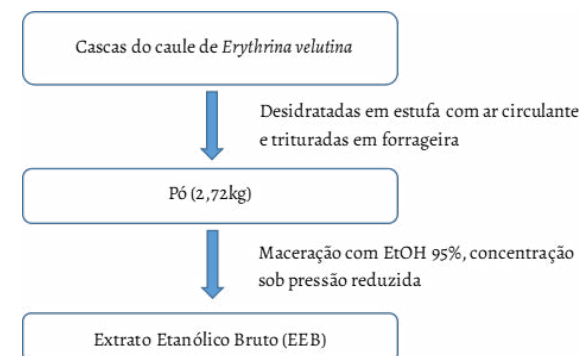
As cascas do caule de *E. velutina* Willd foram coletadas, em maio de 2017, na zona rural do município de Serra Branca, estado da Paraíba. A identificação botânica foi realizada e uma exsicata foi depositada no herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) do Centro de Ciências Exatas e da Natureza–UFPB, apresentando-se como código AGRA *et al.* 2554. Este trabalho foi cadastrado no Sistema

Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob número de cadastro ADD107E. As cascas foram higienizadas para que microrganismos que vivem nas superfícies (epífitos) fossem eliminados de modo que não houvesse nenhuma contaminação. A lavagem das cascas do caule foi realizada com álcool a 70% por 1 minuto, seguida de banho com hipoclorito de sódio 3% por 2 minutos, álcool a 70% novamente por 1 minuto e, para finalizar, foi realizado um banho com água destilada estéril para remover resquícios dos agentes de desinfestação.²⁹

OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO

O material botânico foi desidratado em estufa com ar circulante, à temperatura média de 45°C, durante 72 horas. Em seguida, o material foi triturado em forrageira obtendo-se 2,72 kg de pó. Posteriormente o pó foi submetido à maceração com etanol (EtOH) a 95%, em macerador de aço inoxidável, por 72 horas, sendo este processo repetido por três vezes. A solução extrativa obtida foi concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida à temperatura de 40°C, com objetivo de eliminação do solvente para obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) (Esquema 1).

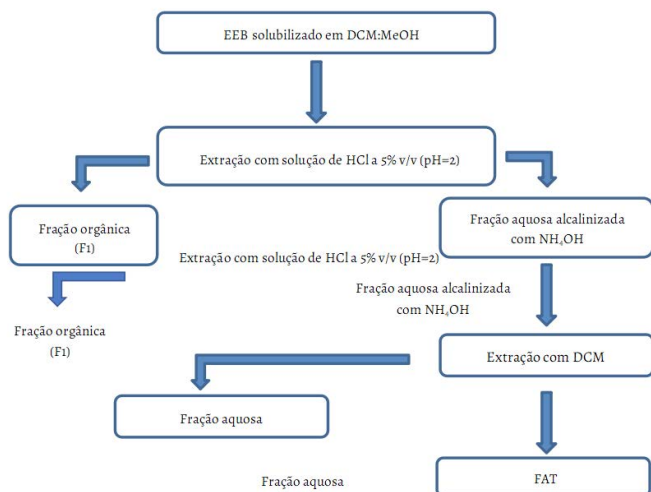
ESQUEMA 1 - OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DAS CASCAS DO CAULE DE *E. VELUTINA*



EXTRAÇÃO ÁCIDO-BASE

A extração ácido-base (EAB) foi utilizada para obtenção de frações enriquecidas com alcaloides do extrato etanólico de *E. velutina*, conforme ilustrado no Esquema 2. Em solução de diclorometano (DCM): metanol (MeOH) (8:2), foi realizada a solubilização do extrato etanólico com auxílio de banho de ultrassom por 20 min. Posteriormente, a fração orgânica (F1) foi extraída com solução de ácido clorídrico (HCl) 5% (v/v). Em seguida, a fração aquosa ácida foi alcalinizada com NH₄OH em volume suficiente para atingir pH = 10. Por fim, a fração aquosa foi extraída com DCM (F2). Após essa marcha química, a fração enriquecida com alcaloides (FAT) obtida foi utilizada nos testes.³

ESQUEMA 2 - EXTRAÇÃO ÁCIDO - BASE (EAB)



DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DOS ALCALOIDES DE *E. VELUTINA WILLD*

ANÁLISE EM CG-EM

As frações obtidas foram analisadas em CG-EM (cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas), em sistema Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra, operando em energia de ionização de 70 eV, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30m x 0,25mm d.i.) com fase estacionária RT-SMS (0,25µm de espessura do filme). O método cromatográfico em fase gasosa empregado foi desenvolvido utilizando injeção no modo *Split* (1/10), temperatura de injeção 250°C; o gás carreador usado foi o hélio ao fluxo de 1,1 mL/min e o gradiente de temperatura empregado foi o seguinte: de 100 a 200°C a 6°C/min, 220°C por 10min, de 220 a 290°C a 6°C/min e, por fim, 290°C por 11min (FEITOSA, 2014). O filtro quadrupolo com varredura de *m/z* de 40 a 400 Da, com volume de injeção de 1µL.

As amostras foram preparadas diluindo-as em MeOH (3mg/mL), seguidas de banho de ultrassom no aparelho USC-1600 da marca Unique, para favorecer a solubilização; e por fim, filtradas em filtro de PVDF com poro de 0,45 µm de diâmetro.

A identificação das substâncias foi efetuada de acordo com a comparação dos espectros de massas (massa molecular e padrão de fragmentação) com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist. 2008) e com espectros e padrões de fragmentação existentes na literatura.^{3,26}

ANÁLISE EM CLAE-IES-EM/EM

Para as análises na CLAE, foram utilizados água ultrapura (purificada em sistema Milli-Q®) acidificada com ácido fórmico (0,1%) (solvente A) e metanol grau de pureza CLAE (Tedia®) (solvente B). As amostras foram solubilizadas em MeOH (1mg/mL) com auxílio de banho de ultrassom (USC-1600 Unique). Por fim, a amostra foi filtrada em filtro de PVDF com poro de 0,45 µm de diâmetro.

O equipamento utilizado para as análises de CLAE-IES-EM/EM foi da marca Shimadzu®, composto por duas bombas de solvente LC20AD, autoinjeter SIL-20A HT, detector de arranjo de diodo (DAD) SPD-M20A, degaseificador DGU-20A_{SR} e controlador sistema CBM20A acoplado a um espectrômetro de massas com analisador tipo Ion-Trap modelo AmazonX-Bruker® em modo positivo. A coluna utilizada na separação cromatográfica foi uma C18 de fase reversa (Kromasil; 250 mm x 4,6 mm x 5 micrómetros).

O método analítico desenvolvido para FAT consistiu em um sistema gradiente com os eluentes água acidificada (0,1% ácido fórmico) (A) e MeOH (B) com detecção em 245 nm. Assim, o gradiente foi iniciado 0-35 min (5-35% B); 35-75 min (35-50% B); 75-140 min (50-90% B); 140-141 min (90-100% B), finalizando a corrida com uma eluição isocrática de 100% de B a 100% de B de 141 até 160 min. O volume de injeção foi de 20 µL com fluxo de 0,6 mL/min.

Os parâmetros de aquisição de Ion Trap foram: voltagem do capilar-4,5 kV, voltagem da placa offset-500V, pressão do gás nebulizador-20 psi, vazão e temperatura do gás de secagem-8 L/min e 300°C, respectivamente e modo de ionização positivo. A fragmentação na célula de colisão (CID) foi obtida no modo auto-EM/EM com resolução aprimorada para obtenção dos espectros EM e EM/EM. Os espectros foram registrados com um intervalo entre m/z 100-1000 a cada 2 segundos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

IDENTIFICAÇÃO DOS ALCALOIDES ERITRÍNICOS POR CG-IE-EM

Na análise do cromatograma da FAT de *E. velutina*, foi observada a presença de 48 picos, dos quais 9 são putativos alcaloides eritrínicos no intervalo de tempo de 31 a 38min, também observados por CG-EM³ utilizando a mesma metodologia. Os dados obtidos por CG-EM da FAT estão na Tabela 1.

TABELA 1-PADRÃO DE FRAGMENTAÇÃO ALCALOIDES DE *E. VELUTINA*

Pico	Tentativa de identificação	Tr (min)	m/z (IE-EM) (intensidade)
A	Erisodina/Erisovina (C ₁₈ H ₂₁ NO ₃)	31,92	299 (37), 284 (36), 269 (27), 268 (100), 266 (19), 253 (12), 241 (11), 228 (13), 215 (23)
B	Eritrascina (C ₂₁ H ₂₅ O ₅ N)	33,29	371 (42), 356 (42), 340 (100), 329 (12)
C	Eritralina (C ₁₈ H ₁₉ NO ₃)	33,77	297 (31), 282 (32), 266 (100), 264 (24), 239 (10), 226 (16)
D	Erisovina ou Erisodina (C ₁₈ H ₂₁ NO ₃)	34,63	299 (37), 284 (36), 268 (100), 253 (12), 241 (11), 228 (13), 215 (23)
E	Eritratidina ou epieritratidina (C ₁₉ H ₂₁ NO ₃)	35,70	331 (2), 300 (13), 273 (50), 272 (15), 257 (100), 256 (54), 244 (60), 242 (15)
F	Eritratidina ou epieritratidina (C ₁₉ H ₂₁ NO ₃)	36,33	331 (2), 300 (13), 273 (50), 272 (15), 257 (100), 256 (54), 244 (60), 242 (15)
G	Erimelantina (C ₁₈ H ₂₀ O ₃ N ₂)	36,72	312 (50), 297 (36), 281 (100), 279 (28), 221 (49)
H	Erisotina ou Erisosalvina (C ₁₈ H ₂₃ NO ₄)	37,58	317 (10), 286 (11), 259 (46), 258 (10), 243 (100), 242 (40)
I	Erisotina ou Erisosalvina (C ₁₈ H ₂₃ NO ₄)	37,88	317 (7), 286 (11), 259 (66), 258 (10), 243 (100), 242 (40)

De acordo com os fundamentos da espectrometria de massas, é possível prever padrões de fragmentação de substâncias de acordo com seus análogos. Com base nisso, foi possível propor a análise dos perfis de fragmentação dos possíveis alcaloides en-

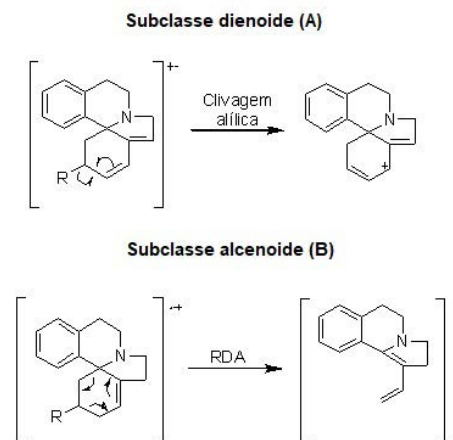
contrados na fração de alcaloides totais de acordo com os padrões de fragmentação para as subclasses dienoides e alcenoides.²⁶

Deste modo, foi possível perceber que, em sistemas dienoides (ligações duplas entre os carbonos 1 e 2, 6 e 7 respectivamente), há uma facilidade para ejeção de um elétron, sendo assim a fragmentação para este tipo de subclasse ocorre por clivagem α -alílica (Fig. 2), dando origem a um íon di-alílico estável, normalmente sendo este o fragmento majoritário do espectro (FEITOSA, 2014; MILLINGTON *et al.*, 1974). Assim, para ocorrer a formação do pico base em um espectro de alcaloides eritrínicos da subclasse dienoide que apresentam metoxila na posição 3 ($R_3 = OCH_3$), ocorre uma clivagem α -alílica [$M^{++}-31$] do íon molecular com perda do radical metóxi nesta posição. Isso pode ser observado na Fig. 2, que mostra o padrão de fragmentação de derivados eritrínicos da subclasse dienoide de acordo com Amer *et al.* (1991). Enquanto que, para alcaloides eritrínicos da subclasse dienoide que apresentam hidroxila na posição 3 ($R_3=OH$), o pico base do espectro de massas se dá devido à fragmentação do íon molecular a partir de clivagem α -alílica [$M^{++}-17$], perdendo o radical hidróxi, o pode ser observado na Fig. 2.³

Para a subclasse alcenoide (ligação dupla entre os carbonos 1 e 6), a ocorrência da reação retro Diels-Alder (RDA) [$M^{++}-58$] é característica para esses derivados eritrínicos (Fig. 2). Barton e colaboradores (1968) e Millington e colaboradores (1974) também apresentaram a proposta de fragmentação por reação de RDA em alcaloides eritrínicos alcenoides. Alguns derivados eritrínicos alcenoides por meio da reação de RDA geram o pico base do espectro, são exemplos: dihidroerisotrina, eritroculina, eritroculinol e eritraulina; enquanto outros geram íons de elevada intensidade, porém não o pico base do espectro como, por exemplo, erisotina, erisosalvina e eritatidina. O padrão de fragmentação é essencial

para distinção das subclasses dos alcaloides eritrínicos, visto que ocorrem de forma diferente para ambas as classes.

FIGURA 1—PADRÃO DE FRAGMENTAÇÃO IE-EM PARA ALCALOIDES ERITRÍNICOS DAS SUBCLASSES DIENOIDES (A) E ALCENOIDES (B)



Baseado nos estudos de fragmentação em IE-EM para alcaloides eritrínicos e nos padrões de fragmentação com ionização por elétrons, discutidas anteriormente neste estudo, foram propostos os mecanismos de fragmentação de alguns íons das vias que envolvem reação de RDA e clivagem α nas subclasses alcenoides e dienoides de acordo com os substituintes ligados ao carbono 2 (para alcenoides), o que contribuiu para identificação destes alcaloides na fração alcaloídica do extrato etanólico de *E. velutina*.^{3,31,32}

Os íons moleculares das substâncias E, F, H e I fragmentam-se por reação de RDA [$M^{++}-58$], perdendo uma molécula neutra (-58 u) e originando o cátion radical em m/z 273 (E e F) e m/z 259 (H e I). Posteriormente o cátion radical resultante da fragmentação do íon molecular fragmenta-se por meio de clivagem guiada pelo radical, com perda de um íon hidrogênio radicalar, originando

os íons em m/z 272 (E e F) e m/z 258 (H e I). Esses íons ainda sofrem fragmentação por meio da perda de uma metila radicalar, em função do aumento do comprimento da ligação de C-O.³ Essa fragmentação dá origem aos íons majoritários nos espectros de massas dos alcaloides encontrados em m/z 257 (E e F) e m/z 243 (H e I). Outra proposta de fragmentação ocorre com os íons originados pela reação de RDA em m/z 273 (E e F) e m/z 259 (H e I), os quais também podem perder uma metila radicalar, originando os íons de m/z 258 (E e F) e m/z 244 (H e I). Para os isômeros erisotina e erisosalvina, a perda da metila radicalar é a da metoxila.

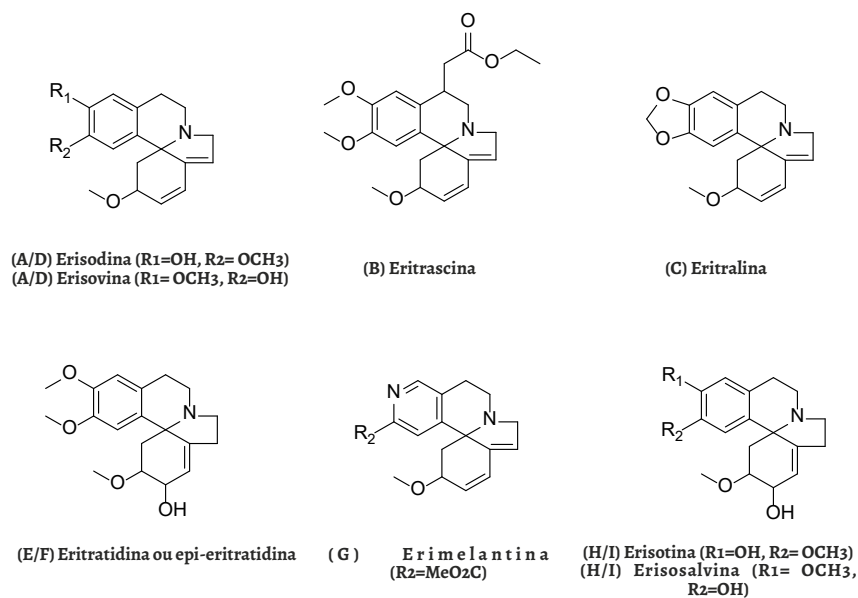
Para a clivagem α , a fragmentação das substâncias E e F ou H e I tem início com a ejeção de um elétron do oxigênio da hidroxila que está ligada ao carbono 2, caracterizando uma outra via de fragmentação. A baixa intensidade dos íons moleculares de eritratidina e seu epímero, erisosalvina e erisotina pode ser justificada pela presença dessa via de fragmentação. A clivagem α dos íons moleculares de m/z 331 (E e F) e m/z 317 (H e I) dá origem aos cátion radicais em m/z 273 (E e F) e 259 (H e I) por meio da perda de uma molécula neutra de 58 u. Posteriormente esses íons radicais podem fragmentar-se por clivagem guiada pelo radical com a perda de um hidrogênio radicalar; em função disso, tem-se a formação dos íons de m/z 272 (E e F) e m/z 258 (H e I), ou fragmenta-se pela perda uma metila radicalar (-15 u) e forma os íons majoritários dos espectros em m/z 257 (E e F) e m/z 243 (H e I). Ambos os mecanismos citados anteriormente sugerem que, tanto na via iniciada por reação de RDA quanto por clivagem α , originam-se os mesmos íons do espectro de massas dessas substâncias.

Alcaloides dienoides encontrados na fração de alcaloídica de *E. velutina* no pico majoritário do cromatograma, pico D, sugerem como sendo erisodina ou erisovina de acordo com o padrão

de fragmentação destas substâncias neste trabalho, bem como^{3,26} os alcaloides dienoides deste estudo possuem metoxila ligada ao carbono 3; em função disso, sugere-se que sofrem fragmentação via clivagem α -alílica [$M^+ - 31$], visto que tendem a ejetar elétrons, gerando o pico base do espectro de massas.³²⁻³⁴

Para o derivado eritrínico referente ao pico D e A, foi sugerido que o íon molecular em m/z 299 fragmenta-se por clivagem α -alílica [$M^+ - 31$], com perda do radical metóxi gerando o íon di-alílico estável em m/z 268 referente ao pico majoritário do espectro de massas. O íon molecular também sofre fragmentação de [$M^+ - 15$] com perda de metila radicalar para formar o íon em m/z 284 com elevada intensidade no espectro de massas.

FIGURA 2—ALCALOIDES ERITRÍNICOS IDENTIFICADOS NA FAT DO EXTRATO DE *E. VELUTINA*



IDENTIFICAÇÃO DOS ALCALOIDES ERITRÍNICOS POR CLAE-IES-EM

A caracterização estrutural dos alcaloides encontrados na FAT do extrato etanólico de *E. velutina* realizada por CLAE-IES-EM no modo de ionização positivo (IES⁺) é apresentado na Tabela 2. Os constituintes da FAT foram identificados com base no padrão de fragmentação destes comparados com os obtidos na literatura, assim foi possível sugerir a presença de 23 possíveis alcaloides eritrínicos.

Como proposta para as fragmentações sofridas pelos alcaloides eritrínicos presentes na FAT de *E. velutina*, tem-se um padrão de mecanismos que ocorre de forma intensa para estas substâncias, visto que as perdas de H₂O, CH₃OH, CH₃[•] e CO acontecem em todos os alcaloides estudados, não necessariamente na ordem citada. Com base nos estudos de fragmentação, foi possível propor as fragmentações mais comuns para as substâncias estudadas.^{3, 35-37}

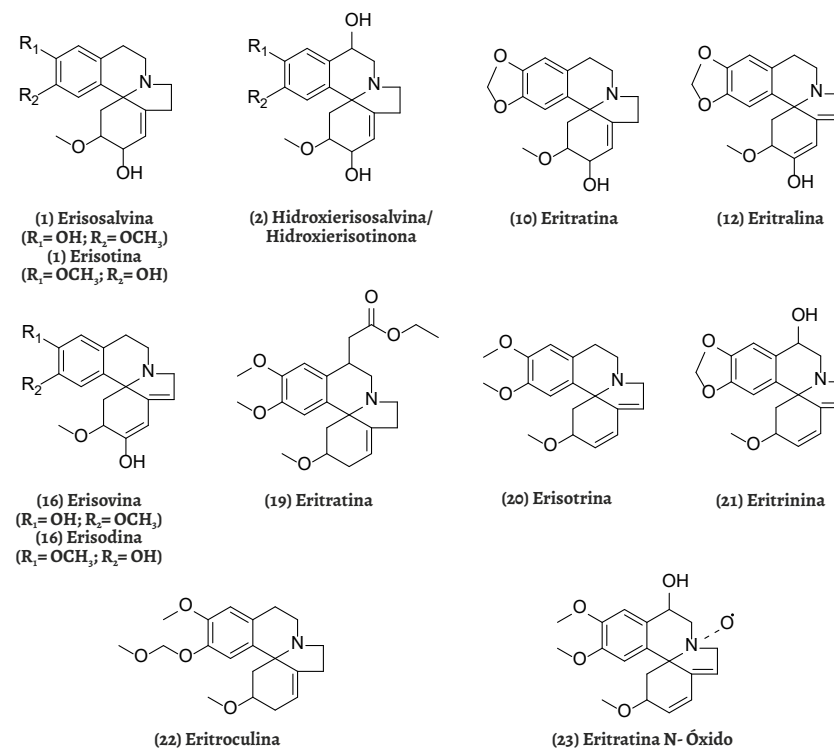
TABELA 2—CARACTERIZAÇÃO DOS ALCALOIDES IDENTIFICADOS NA FAT DE *E. VELUTINA* POR CLAE-IES-EM-EM

Composto	Tr(min)/(Pico)	Fórmula molecular	[M+H] ⁺	MSn (m/z)	Tentativa de identificação	Referência
1	17,8 (1)	C ₁₈ H ₂₄ NO ₄	318	300, 286, 268	Erisotina ou Erisosalvina	3
2	19,5 (2)	C ₁₈ H ₂₄ NO ₄	318	300, 286, 268	Erisotina ou Erisosalvina	3
3	19,5 (2)	C ₁₈ H ₂₄ NO ₅	334	316, 284, 256, 302	Hidroxisalisolmina ou hidroxisalisotina	26
4	20,5 (3)	C ₁₈ H ₂₄ NO ₄	318	300, 286, 268	Erisotina ou Erisosalvina	3
5	20,5 (3)	C ₁₈ H ₂₄ NO ₅	334	316, 284, 256, 302	Hidroxisalisolmina ou hidroxisalisotina	26
6	21,3 (4)	C ₁₈ H ₂₄ NO ₄	318	300, 286, 268	Erisotina ou Erisosalvina	3
7	21,3 (4)	C ₁₈ H ₂₄ NO ₅	334	316, 284, 256, 302	Hidroxisalisolmina ou hidroxisalisotina	26
8	22,3 (5)	C ₁₈ H ₂₄ NO ₄	318	300, 286, 268	Erisotina ou Erisosalvina	3
9	22,3 (5)	C ₁₈ H ₂₄ NO ₅	334	316, 284, 256, 302	Hidroxisalisolmina ou hidroxisalisotina	26
10	23,8 (6)	C ₁₈ H ₂₂ NO ₄	316	298, 284, 266	Erisotinona, erisosalvinona, eritroculinol, eritratina e epieritratina	3
11	23,8 (6)	C ₁₈ H ₂₀ NO ₃	298	266, 251	Eritralina	3
12	24,3 (7)	C ₁₈ H ₂₀ NO ₃	298	266, 251	Eritralina	3
13	24,3 (7)	C ₁₈ H ₂₂ NO ₄	316	298, 284, 266	Erisotinona, erisosalvinona, eritroculinol, eritratina e epieritratina	3
14	25,5(8)	C ₁₈ H ₂₀ NO ₃	298	266, 251	Eritralina	3
15	25,5 (8)	C ₁₈ H ₂₂ NO ₄	316	298, 284, 266	Erisotinona, erisosalvinona, eritroculinol, eritratina e epieritratina	3
16	27,3 (9)	C ₁₈ H ₂₂ NO ₃	300	268, 253, 225	Erisovina ou erisodina ou eritramina	3
17	30,5 (10)	C ₁₈ H ₂₂ NO ₄	316	298, 284, 266	Erisotinona, erisosalvinona, eritroculinol, eritratina e epieritratina	3
18	31,4 (11)	C ₁₈ H ₂₂ NO ₄	316	298, 284, 266	Erisotinona, erisosalvinona, eritroculinol, eritratina e epieritratina	3
19	33,7 (12)	C ₂₁ H ₂₆ NO ₅	372	340	Eritrascina	26
20	33,7 (12)	C ₁₈ H ₂₀ NO ₄	314	282, 267	Erisotrina ou 8-oxoerisodina	3
21	36,5 (13)	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	296	281, 264	Eritrina	3
22	38,3 (14)	C ₂₀ H ₂₆ NO ₄	344	329, 312	Eritroculina ou eristemina	3
23	39,1 (15)	C ₁₉ H ₂₄ NO ₅	346	331	Eritratina n-oxido	26

Para isso, foi utilizada como exemplos a fragmentação dos alcaloides hidroxierisosalvina e erisodina. Estes foram selecionados porque, em suas fragmentações, é possível demonstrar as perdas mais frequentes em alcaloides do gênero *Erythrina*. Para o alcaloide erisodina, ocorre a perda de uma molécula de CH_3OH (32 *u*) de acordo com o mecanismo proposto por Stévigny e colaboradores (2004) com a formação de um epóxido, formando o íon em *m/z* 268, seguido da perda de metila radicalar para formação do íon em *m/z* 253; e por fim, ocorre a perda de um CO, gerando o íon em *m/z* 225. Estes são mecanismos comuns para alcaloides aporfínicos.^{37,38}

A fragmentação proposta para o alcaloide hidroxierisosalvina tem início com a perda de uma molécula de H_2O (18 *u*), gerando o íon em *m/z* 316 por meio de rearranjo remoto de hidrogênio,³⁶ seguido da perda de uma molécula de CH_3OH (32 *u*), formando o íon em *m/z* 284, seguido da perda de CO com a formação do íon em *m/z* 256.³⁷ Outra via de fragmentação do íon molecular em *m/z* 334 ocorre para geração do fragmento em *m/z* 302, a partir da perda de uma molécula de CH_3OH (32 *u*). Estes são mecanismos comuns para alcaloides aporfínicos. Todos os compostos tentativamente identificados estão na Fig. 3.

FIGURA 3—ALCALOIDES ERITRÍNICOS IDENTIFICADOS NA FAT DE *E. VELUTINA* POR CLAE-IES-EM



CONCLUSÕES

A combinação da ionização por impacto de elétrons com a ionização por *electrospray*, juntamente com os dados de espectrometria de massas, permitiu a identificação de 9 possíveis alcaloides eritrínicos por meio CG-IE-EM e de 23 possíveis alcaloides nas análises por CLAE-IES-EM, presentes na fração de alcaloides totais do extrato das cascas do caule de *E. velutina*. Os resultados obtidos pela combinação dos dados cromatográficos, unidos à espectrometria de massas, permitiram a identificação das substâncias citadas neste trabalho sem a necessidade do seu isolamento, de acordo com os padrões de fragmentações previamente descritos na literatura, bem como o mecanismo de fragmentação sofrido pelos alcaloides eritrínicos.

Dessa forma, o presente estudo foi de grande valia para o conhecimento do arsenal de constituintes químicos da espécie e a obtenção de dados químicos de marcadores do gênero *Erythrina*, uma espécie muito utilizada na medicina popular pelas suas atividades no SNC, porém pouco estudada. Apesar de as substâncias mencionadas neste trabalho já terem sido descritas na literatura, este estudo contribuiu evidenciando que esta espécie apresenta alcaloides com potencial ansiolítico, antinociceptivo e anticonvulsivante, visando a estudos mais detalhados para trabalhos posteriores.

REFERÊNCIAS

1. Carvalho JE. Toxicidade pré-clínica: fitoterápicos e alimentos com propriedades funcionais ou de saúde. [Intenet] 2004. [cited 2016 out 6]. Available from: www.abma.com.br/2004/notes/205.pdf.
2. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod*. 2016 79: 629-61.
3. Feitosa LGP. Caracterização dos alcaloides eritrínicos de *Erythrina verna*. [dissertation]. [Ribeirão Preto (SP)]: Universidade de São Paulo, 2014. 124 p.
4. Merlugo L. Análise cromatográfica, constituição química em alcaloides e avaliação do potencial hipotensor de extratos vegetais obtidos de espécies de *Erythrina*. [dissertation]. [Uruguaiiana (RS)]: Universidade Federal do Pampa, 2015. 69 p.
5. Kerbauy GB. Fisiologia Vegetal. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 469 p.
6. Martins-Da-Silva RCV. Coleta e Identificação de espécimes botânicos. Belém Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), 2002, 40 p.
7. Schenkel EP et al. Plantas tóxicas. In: Simões CMO, Schenkel EP; Gosmann G., Mello, JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia – Da planta ao medicamento. 6ª edição. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. cap. 37, p. 959-993.
8. Silva MMB. Estudo farmacognóstico de *Erythrina velutina* Willd (Fabaceae). [dissertation]. [Recife (PE)]: Universidade Federal de Pernambuco, 2012. 71 p.
9. IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Ecossistemas. Caatinga. [Intenet]

2016. [cited 2016 out 7]. Available from: <http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/Caatinga.htm>.
10. Ferreira C. Descoberta metagenômica da dinâmica do microbioma da rizosfera de Mandacaru na Caatinga. [dissertation]. [Piracicaba (SP)]: Universidade de São Paulo, 2014. 88 p.
 11. Anhesine NB. Perfil cromatográfico (*fingerprinting*) por LC-DAD-MS de espécies do gênero *Erythrina*: desenvolvimento e validação de método para controle de qualidade de drogas vegetais. [dissertation]. [Araraquara (SP)]: Universidade Estadual Paulista, 2018. 176 p.
 12. Cabral ALGS. Constituintes químicos de *Erythrina velutina* Willd. (FABACEAE). [dissertation]. [João Pessoa (PB)]: Universidade Federal da Paraíba, 2009. 179 p.
 13. Grela ER, Studzioski TE, MATRAS J. Antinutritional factors in seeds of *Lathyrus sativus* cultivated in Poland. *Lathyrus Lathyrism Newsletter*. 2001 2: 101-4.
 14. Carvalho PER. Mulungu (*Erythrina velutina*). Circular técnico 160. Colombo: Embrapa Florestas. 2008. 6 p.
 15. Silva-Júnior VT. Biometria, germinação e crescimento inicial de *Erythrina velutina* Willd. (Leguminosae–Papilionoideae) ocorrente em caatinga e brejo de altitude (PE). [dissertation]. [Recife (PE)]: Universidade Federal de Pernambuco, 2005. 70 p.
 16. Queiroz LP. Leguminosas da caatinga. Feira de Santana: Editora Universitária UEFS. 2009. 443 p.
 17. Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2002. 512 p.
 18. Vasconcelos SM et al. Antinociceptive activities of the hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in mice. *Biol Pharm Bull*. 2003 26 (7): 946-9.
 19. Melo ICAR. Contribuição ao conhecimento de *Erythrina velutina* Willd. (Fabaceae-Faboideae): Uma abordagem Farmacobotânica, Química e Farmacológica. [dissertation]. [João Pessoa (PB)]: Universidade Federal da Paraíba, 2011. 99 p.
 20. Vasconcelos SM et al. Anticonvulsivant activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu*. *J Ethnopharmacol*. 2007 110(2): 271-4.
 21. Dantas MC et al. Central nervous system effects of the crude extract of *Erythrina velutina* on rodents. *J Ethnopharmacol*. 2004 94 (1): 129-33.
 22. Ozawa M, Honda K, Nakai I, Kishida A, Ohsaki A. Hypaphorine, an indolealkaloid from *Erythrina velutina*, induced sleep on normal mice. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008 18: 3992-4. Martins FMM. Estudo da Influência de Fatores
 23. Ambientais na Composição Química e Atividades Biológicas de *Xylopia sericea* St.Hill. [dissertation]. [São Mateus (ES)]: Universidade Federal do Espírito Santo; 2012. 88p.

24. Santos MRV, Alves PB, Antonioli AR, Marchioro M. Relaxant effects of the aqueous extract of *Erythrina velutina* leaves on rat vas deferens. *Rev Bras Farmacogn.* 2007 17(3): 343-8.
25. Ozawa M, Etoh T, Hayashi M, Komiyama K, Kishida A, Ohsaki A. TRAIL – enhancing activity of Erytrinan alkaloids from *Erythrina velutina*. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009 19(1): 234-6.
26. Amer ME, Shamm M, Freyer AJ. The tetracyclic Erythrina alkaloids. *J Nat Prod.* 1991 54(2): 329-363.
27. Rabelo LA, Agra MF, Da-Cunha EVL, Silva MS, Barbosa-Filho JM. Homohesperetin and phaseollidin from *Erythrina velutina*. *Biochem Syst Ecol.* 2001 29(5): 543-4.
28. Da-Cunha EVL, Dias C, Barbosa-Filho JM, Gray AI. Eryvelutinone, an isoflavanone from the stem bark of *Erythrina vellutina*. *Phytochemistry.* 1996 43(6): 1371-3.
29. Araújo WL, Lima AOS, Azevedo JL et al. Manual de isolamento de microrganismos endofíticos. Piracicaba: Universidade de São Paulo; 2002. 86 p.
30. Barton DH et al. Phenol Oxidation and biosynthesis. The structure and biosynthesis of *Erythrina* Alkaloids. *J Chem Soc C: Organic.* 1968, 1529–37.
31. Millington DS, Steinman DH, Rinehart JR. Isolation gas-chromatography-mass spectrometry and, structures of new alkaloids from *Erythrina folkersii* and *Erythrina salviflora*. *J Americ Chem Soc.* 1974 96: 1909-17.
32. Boar RB, Widdowson D. Mass spectra of the *Erythrina* Alkaloids: a novel fragmentation of the spiran system. *J Cheml Soc B: Physical Organic.* 1970, 1591-5.
33. Pelletier SW. Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives. New York: Wiley, Vol 9. 1983. 303 P.
34. Phillipson JD, Roberts MF, Zenk MH. The chemistry and biology of isoquinoline alkaloids. Berlin: Springer-Verlag. 1985. 304 p.
35. Guaratini T. Gas-phase dissociation study of erythrinian alkaloids by electrospray ionization mass spectrometry and computational methods. *J Mass spectrom.* 2017 52: 571-9.
36. Demarque DP, Crotti AE, Vessecchi R et al., Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. *Nat Prod Rep.* 2016 33(3): 432–55.
37. Stévigny CJ, Jean LRR, Hoffmann ED, Quetin-Leclercq J. Key fragmentation patterns of aporphine alkaloids by electrospray ionization with multistage mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2004 18 (5): 523-8.
38. Silva MAF et al. Positive electrospray ionization ion trap mass spectrometry and abinitio computational studies of the multi-pathway fragmentation of oxoaporphine alkaloids. *J Mass Spectrom.* 2017 418: 30-6.

AVALIAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO NA PRODUÇÃO DE AGUARDENTE DE SERIGUELA (*SPONDIAS PURPUREA*)

Bernadete de Farias Ramos

Universidade Federal de Campina Grande
Sumé – PB – bernadete_farias@hotmail.com

Éder do Nascimento Sousa

Universidade Federal de Campina Grande
Sumé – PB – eder_gh@hotmail.com

Bruno Rafael Pereira Nunes

Universidade Federal de Campina Grande
Sumé – PB – bruno.nunes@ufcg.edu.br

INTRODUÇÃO

As regiões Norte e Nordeste do Brasil possuem grande destaque no que diz respeito ao cultivo de frutas tropicais, que suportam as variações climáticas presentes nos estados produtores e apresentam potencial para o desenvolvimento de produtos com valor agregado¹.

Uma dessas frutas é a seriguela (*spondias purpurea*), que é originária da América Central, também conhecida como ceriguela, ciriguela, entre outras denominações; e pertence à família das *Anacardiaceae*. O gênero *Spondias* apresenta um elevado destaque comercial por produzir frutas de sabor agradável, encontradas no mercado principalmente na forma *in natura* ou como polpa².

É caracterizada por ser um fruto de coloração vermelho-escuro, quando está madura, e apresenta sabor agradável, com ele-

vado nível de aceitação no mercado^{3,4}, por ser rica em açúcares. Essa quantidade vai aumentando de acordo com a maturidade da fruta. Entre esses açúcares, glicose, frutose e sacarose são encontrados em maior quantidade⁵.

O fruto possui bastante valor nutritivo por apresentar em sua composição 6,70% de açúcares redutores, 1% de amido, 70,22% de rendimento médio de polpa, 21,25°Brix, 0,62% de acidez titulável (ácido cítrico), com índice de maturação de 34,32 e pH 3,44^{6,7}. A seriguela apresenta, em sua composição, carboidratos, fósforo, ferro, vitaminas A, B e C, e metabólitos secundários, como os compostos fenólicos^{8,9}.

As frutas que apresentam maiores teores de açúcares podem ser utilizadas para a produção de bebidas fermentadas, desde que contenham teores de sais, umidade e nutrientes adequados para o processo fermentativo¹⁰. A fermentação ocorre por meio de microrganismos, principalmente leveduras e bactérias. As leveduras desempenham uma função essencial para o desenvolvimento de um fermentado de frutas¹¹. Tal microrganismo atua convertendo o açúcar da fruta em álcool etílico, gás carbônico e outros elementos secundários, que são formados durante o processo fermentativo em parcela variada e contribuem para a qualidade do fermentado¹². Através do estudo cinético dos processos fermentativos, é possível determinar alguns parâmetros importantes, como a velocidade em que um substrato é consumido, a formação do produto e, no caso de processos que ocorrem por meio de leveduras, é obtido o conhecimento da velocidade de crescimento celular e como a levedura pode influenciar o processo fermentativo¹³.

As concentrações dos componentes do meio de cultivo, em um determinado tempo de processo, podem ser relacionadas entre si, fornecendo os fatores de conversão de substrato em concentração celular ($Y_{X/S}$), concentração celular em produto ($Y_{X/P}$)

e substrato em produto ($Y_{P/S}$), como mostrados respectivamente nas Equações 1, 2 e 3¹⁴.

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad \text{Equação (1)}$$

$$Y_{X/P} = \frac{X - X_0}{P - P_0} \quad \text{Equação (2)}$$

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad \text{Equação (3)}$$

Industrialmente é essencial ter o conhecimento dos dados cinéticos de um processo fermentativo, pois é possível analisar os perigos, os pontos críticos do processo e determinar o tempo de vida útil do produto¹². A importância também está no fato de que, quando o processo é realizado em escala laboratorial, é possível ampliá-lo para nível industrial, realizando esta ampliação através das comparações das variáveis quantitativas do processo entre as duas escalas¹⁴.

Quando o mosto, após o processo fermentativo, passa pelo processo de destilação, tem-se como produtos bebidas destiladas, também conhecidas como aguardentes. Através da destilação do mosto fermentado ou da destilação alcoólica simples do fruto, é possível obter uma aguardente com aspectos diferenciados e marcantes. Características como sabor, aroma e todos os elementos formados durante o processo fermentativo devem ser preservadas no produto¹⁵.

A aguardente é um produto caracterizado por possuir uma elevada graduação alcoólica¹⁶, sendo este elevado teor de etanol um diferencial das bebidas fermento-destiladas com relação ao fermentado de fruto¹⁷. As aguardentes de frutas são conhecidas como fermento-destiladas, tendo como principais componentes a água e o etanol¹⁸.

Existe uma diversidade enorme de matérias-primas que são utilizadas para a produção de bebidas destiladas. No Brasil, as matérias-primas são selecionadas pela presença de açúcares ou amido, seja de origem animal ou vegetal, cujas substâncias por meio da ação das leveduras são quebradas e convertidas em etanol^{19,20}. A aguardente de cana-de-açúcar é conhecida como cachaça e possui graduação alcoólica variando de 38 a 54% a 20°C²¹. Já as aguardentes provenientes de frutos devem possuir um teor alcoólico de 36 a 54% a 20°C²².

Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma bebida fermentada utilizando como substrato a polpa da seriguela, por ser uma fruta que apresenta elevados teores de açúcar; durante o processo, realizar a análise cinética da fermentação alcoólica, comparando os resultados obtidos quando se conduz o processo em dois tipos de reatores, um com agitação e outro sem agitação; e em seguida, realizar a destilação do fermentado para obtenção da aguardente de seriguela, com o propósito de desenvolver um produto que apresente potencial para a comercialização.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no laboratório de Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da UFCG, entres os meses de dezembro de 2017 e abril de 2018.

MATÉRIA-PRIMA

Para a realização do trabalho, foram utilizados cerca de 4,0 kg de polpa de seriguela, obtidos em estabelecimento comercial situado no município de Campina Grande-PB, tendo em vista a dificuldade em obter o fruto *in natura* durante o período de desenvolvimento da pesquisa. O material ficou armazenado em congelador até o início do trabalho.

MICROORGANISMO

O microrganismo utilizado foi a levedura *Sacharomyces cerevisiae* – fermento biológico comercial em pó, sendo este o responsável por metabolizar os açúcares anaerobicamente.

MOSTO: PREPARO E CORREÇÕES

A polpa da fruta foi processada em um liquidificador doméstico (da marca Arno), com o uso de 750,0 mL de água mineral para cada kg de polpa, adquirindo-se 7,8 L de mosto para os 4,0 kg de polpa. O volume total do mosto passou por um processo de aquecimento até o início da ebulição, seguido de uma filtração, em filtro de tecido, para remoção das partículas sólidas de tamanhos maiores. Em seguida, foi realizada a chaptalização, um processo utilizado para correção da quantidade de açúcar presente no mosto por meio da adição de sacarose, quando o açúcar contido no fruto não se encontra na quantidade adequada para atingir a graduação alcoólica mínima desejada para o fermentado²³. Foi realizada a análise do brix inicial do mosto por meio do refratômetro ABBE de bancada, modelo Q767B da marca Quimis; e em seguida, foram adicionados 850g de açúcar cristal ao volume

total do mosto, alcançando-se um teor de sólidos solúveis totais de 16°Brix.

A próxima etapa da preparação do mosto foi a correção do pH. Por meio da utilização do pHmetro digital PH 2600 da marca Instrutherm, foi realizada a visualização do pH do mosto de seriguela após a chaptalização. Em seguida, para redução da acidez do mosto, foi utilizada uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,2 M. Após as etapas de correção, o mosto foi autoclavado a 121°C e 1 atm, por 30 minutos, em Erlenmeyers e no reator de bancada, para garantir a assepsia do processo.

FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Nesta etapa, foram realizados dois processos em batelada, sendo um com agitação e outro sem. Para a fermentação com agitação, utilizou-se o reator de bancada com capacidade de 1,2 L, da marca TECNAL modelo Biotec-C (Fig. 1).

FIGURA 1—REATOR UTILIZADO NO PROCESSO FERMENTATIVO COM AGITAÇÃO



O processo fermentativo realizado em modo descontínuo com agitação ocorreu no reator agitado por meio de dois impelidores, no qual foi inoculado 1200 mL do mosto com 6g da levedura (5 gL^{-1}). O inóculo foi realizado em câmara de fluxo laminar, mantendo toda a assepsia do processo. Após o término do inóculo, o reator foi ligado para dar início ao processo fermentativo. Um recipiente de vidro contendo água foi conectado ao reator, por meio de uma mangueira, para impedir a entrada de ar durante a liberação de gás carbônico que ocorre no processo fermentativo. A fermentação ocorreu sob uma agitação de 350 rpm. A cada 2 horas, alíquotas de 10 mL do mosto eram retiradas em uma seringa para determinação da concentração celular, do °Brix e do pH do mosto por um período de 24 horas. Após esse período, as amostras eram retiradas, a cada 12 horas, até o término do processo.

Para a condução do processo sem agitação, foi utilizada como reator uma garrafa PET, com capacidade de 10 L. Na parte inferior, foi instalada uma torneira para coleta de amostras do mosto, como apresentado na Fig. 2:

FIGURA 2—REATOR UTILIZADO NO PROCESSO FERMENTATIVO SEM AGITAÇÃO



O inóculo foi preparado em câmara de fluxo laminar, adicionando um volume de 6L do mosto com 30g da levedura (5g de levedura por L de mosto). O mosto permaneceu no reator por 7 dias, em temperatura ambiente. Durante este período, foram determinadas as concentrações de células e de sólidos totais em °Brix, além do pH do meio reacional. Inicialmente, alíquotas de 10 mL foram coletadas a cada 2 horas nas primeiras 24 horas. Nos demais dias, foi coletada apenas uma amostra a cada 24 horas.

PARÂMETROS CINÉTICOS DO PROCESSO FERMENTATIVO

Para a obtenção dos parâmetros cinéticos do processo fermentativo, os resultados obtidos por meio da coleta das alíquotas de 10mL, em intervalos de tempo definidos, foram utilizados.

CRESCIMENTO CELULAR

A concentração de células foi determinada a partir da filtração a vácuo das amostras em papel em filtro, sendo os papéis previamente submetidos a secagem em estufa a 50°C por 24 horas para determinação da sua massa (M1). O papel filtro contendo as células retiradas também passou por um processo de secagem em estufa a 55°C por 24 horas. Após a secagem, com o auxílio de uma balança analítica, foi possível determinar a massa do conjunto (papel + células) (M2). Os cálculos para obter a massa celular (x), em gramas por litro, para cada amostra filtrada foram realizados através da Equação (4)²⁴.

$$X(gL^{-1}) = (M_2 - M_1) \times 100 \quad \text{Equação (4)}$$

CONSUMO DO SUBSTRATO

Para determinação do teor de sólidos solúveis totais (TSS) expressos em °Brix, foi utilizado o refratômetro de bancada (Abbe EE90006B), previamente calibrado. A partir do resultado obtido, foi calculada a concentração de sacarose do mosto expressa em gramas de sacarose por litro de mosto, com base na Equação (5)²⁵:

$$\text{sacarose } (gL^{-1}) \equiv 10,13 \times TSS + 1,445 \quad \text{Equação (5)}$$

PRODUÇÃO DE ETANOL

A determinação do teor de etanol do fermentado foi realizada utilizando-se dados coletados com o refratômetro, que mede o °Brix. A partir desta medida, foi estimada a concentração de álcool etílico por meio da conversão do valor em °Brix, apresentado pelo refratômetro, para %ABV (mL de álcool por 100 mL de solução), utilizando-se a ferramenta disponível em: <http://onebeer.net/refractometer.shtml>. O cálculo se baseia nas relações entre a quantidade de sólidos solúveis, presentes no início e ao término do processo, e a densidade do meio. Para um menor teor de sólidos solúveis, a solução apresenta uma menor densidade, o que indica um maior teor de etanol.

DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO E DA PRODUTIVIDADE

A fermentação alcoólica pode ser representada pela equação química:



A partir da estequiometria da reação e conhecendo-se a densidade do etanol, é possível determinar a concentração de etanol máxima teórica (Q_t). Com os dados coletados durante o processo, pode-se determinar a concentração de etanol experimental (Q_e). Os resultados, expressos em (g/L), foram encontrados por meio da utilização das Equações (6) e (7):

$$Q_t = \frac{\text{g de sacarose}}{\text{L de mosto}} \times 0,682 \frac{\text{mL de etanol}}{\text{g de sacarose}} \times 0,789 \frac{\text{g de etanol}}{\text{mL de etanol}} \quad \text{Equação (6)}$$

$$Q_e = \frac{\text{mL de etanol}}{100 \text{ mL de mosto}} \times 0,789 \frac{\text{g de etanol}}{\text{mL de etanol}} \times \frac{1000 \text{ mL de mosto}}{1 \text{ L de mosto}} \quad \text{Equação (7)}$$

Para determinar o rendimento (R) e a produtividade (P), foram utilizadas as Equações (8) e (9), respectivamente, em que Q_e = concentração de etanol experimental (gL^{-1}), Q_t = máxima concentração de etanol teórica (estequiométrica) (gL^{-1}), e t = tempo de fermentação (h).

$$R(\%) = \frac{Q_e}{Q_t} \times 100 \quad \text{Equação (8)}$$

$$P(\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}) = \frac{Q_e}{t} \quad \text{Equação (9)}$$

CENTRIFUGAÇÃO

Ao término do processo fermentativo, foi realizada a centrifugação do fermentado com o uso da centrífuga da marca Lo-

gen Scientific. Processo foi realizado com o objetivo de atingir um produto livre ao máximo de impurezas, promovendo a sedimentação das partículas mais espessas. Logo após a separação, o fermentado foi armazenado em garrafas PET de 1,5 L, que foram acondicionadas em geladeira.

DESTILAÇÃO

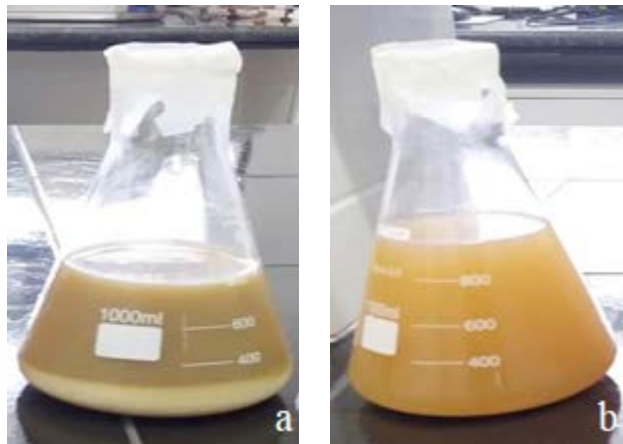
A destilação foi realizada com o auxílio de um destilador artesanal, formado por um sistema de aquecimento, composto por uma chapa da marca Logen, a caldeira do destilador, sendo uma panela de pressão com capacidade para 4,5L; e o sistema de resfriamento, composto por um balde e uma mangueira conectada a uma torneira e a uma serpentina de condensação feita com tubo de cobre. Um béquer foi utilizado para a coleta do destilado e um densímetro alcoômetro (Alcoolômetro Gay-Lussac-Incoterm), para determinação do teor alcoólico.

Foram coletados os 10% iniciais, referentes à fração cabeça. A fração coração foi obtida de acordo com o teor alcoólico desejado, sendo este correspondente a 41%. O volume restante, que corresponde à fração cauda, foi descartado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo fermentativo utilizando polpa de seriguela como substrato foi conduzido em reatores em batelada, com e sem agitação. O fermentado obtido quando o processo foi realizado com agitação apresentou uma cor mais escura com a presença de turbidez, como se observa na Fig. 3(a); por outro lado, o produto obtido no reator em batelada sem agitação apresentou uma coloração mais clara e uma aparência menos turva, conforme apresentado na Fig. 3(b).

FIGURA 3—FERMENTADO DE SERIGUELA OBTIDO NO PROCESSO COM (A) E SEM AGITAÇÃO (B)



Essa cor turva geralmente surge pela presença de proteínas, também conhecida como “nuvem proteica”. Essas proteínas vão sendo desnaturadas e formando agregados proteicos insolúveis durante todo o processo fermentativo, o que pode gerar a turbidez presente na amostra²⁶.

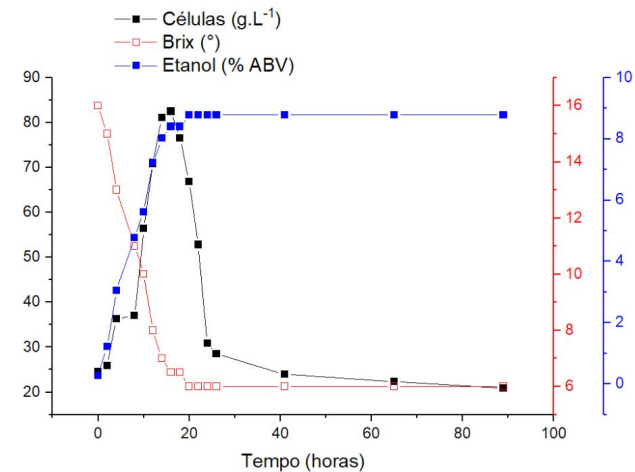
CINÉTICA DOS PROCESSOS FERMENTATIVOS EM BATELADA COM E SEM AGITAÇÃO

Por meio do estudo cinético de uma fermentação, é possível construir as curvas de cinética e adquirir os parâmetros que permitem avaliar o desempenho do processo. Além disso, é possível observar a velocidade em que o substrato está sendo consumido e a formação do produto em função do tempo, bem como o crescimento celular e a influência da levedura utilizada no processo¹³.

Na Fig. 5, é apresentada a curva cinética do processo fermentativo com agitação. Através da análise desta curva, é possível compreender os perfis de crescimento celular (gL^{-1}), de consumo

de substrato ($^{\circ}\text{Brix}$) e da produção de etanol ($\% \text{ABV}$) em função do tempo de fermentação. Para este modo de operação, o mosto permaneceu no reator por 89 horas.

FIGURA 4—REPRESENTAÇÃO DO PERFIL CINÉTICO DA PRODUÇÃO DO FERMENTADO DE SERIGUELA EM REATOR COM AGITAÇÃO



Verifica-se, durante o processo fermentativo com agitação, que a fase de adaptação celular ocorreu até a oitava hora de fermentação, quando o crescimento celular foi mais lento; sendo que durante esse período, a concentração celular variou de 24,5 a 37,0 gL^{-1} . A fase de transição, em que ocorre o início da reprodução, seguiu até as 16 horas de processo fermentativo, havendo um aumento gradual do crescimento, sendo alcançada uma concentração de 82,5 gL^{-1} . O elevado crescimento celular dessa fase ocorre devido à grande quantidade de substrato presente no meio e à ausência de inibidores²⁷. Em seguida, ocorreram o declínio e a morte celular, em que se obteve uma concentração de 20,9 gL^{-1} como valor final. A fase de declínio indica a perda da capacidade de divisão celular, o que leva a uma elevada taxa de morte da levedura²⁸.

Em estudo sobre a fermentação do mosto de cagaita, foi verificado que a fase lag ocorreu entre o início do processo até a 5ª hora, em que ocorre o período de adaptação do microrganismo. A segunda fase, caracterizada pela transição e pelo início do crescimento celular, ocorreu entre a 5ª e a 12ª hora; e a fase exponencial (log) situou-se após as 12 horas²⁸, sendo este comportamento um pouco diferente do observado na Fig. 5.

O consumo do substrato ocorreu de forma rápida até as 16 horas de fermentação, o que permite afirmar que a levedura utilizada no processo se adaptou ao meio. Em seguida, o substrato apresentou tendência a atingir uma concentração constante, verificando-se um decaimento mais lento, provavelmente devido ao aumento da concentração de etanol no meio, o que inibe a atuação do microrganismo. No final do processo, o fermentado atingiu um valor de 6,0° Brix, equivalente a 62,225 gL⁻¹ de sacarose, sendo que esse resultado foi obtido através da conversão do teor de sólidos solúveis para sacarose, aplicando a Equação 5. Esse rápido decaimento do teor de sólidos solúveis no início do processo indica que, no mosto, estão presentes altas quantidades de açúcares fermentáveis, que favorecem o processo fermentativo²⁹. É importante a verificação da velocidade em que o substrato está sendo consumido, pois através desses valores é possível analisar e controlar a qualidade e a eficiência do processo³⁰.

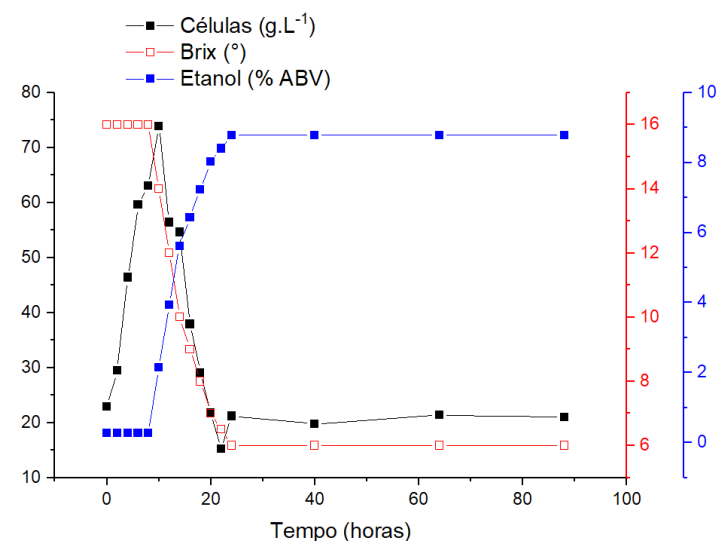
Em outro estudo, os pesquisadores encontraram valores em torno de 5,0° Brix para o fermentado de ata (fruto também conhecido como pinha); e entre 5,4 e 6,5° Brix para a fermentação do mosto de mangaba, sendo estes valores próximos aos apresentados no presente estudo. As fermentações, em ambos os processos, foram conduzidas em vasilhames de aço inox, sob temperaturas de 18 a 21°C, pelo período de 21 dias²⁹.

Com base no monitoramento cinético, a produção de etanol foi verificada e o teor de etanol, expresso em %ABV, foi aumen-

tando gradativamente em função do tempo de fermentação, até a estabilização decorridas 20 horas, apresentando um valor final de 8,78%ABV. Valores próximos foram encontrados para outros fermentados de frutos, relatados na literatura. Em um estudo da obtenção do fermentado à base de jambolão e do caldo de cana-de-açúcar, com fermentação realizada em recipientes de vidro com capacidade para um litro, foi observado um teor alcoólico médio, para cinco tratamentos, de 8%ABV³¹. Em outros estudos, foi encontrado para o fermentado de jaboticaba o valor de 12 %ABV³², sendo o mesmo valor obtido para o fermentado de cajá³³. Essas diferenças ocorrem em função da quantidade, inicial e final, de açúcar presente em cada processo fermentativo³¹.

Na Fig. 6, é apresentada a curva cinética do processo fermentativo sem agitação. Para este modo de operação, o mosto permaneceu no reator por 88 horas.

FIGURA 5—REPRESENTAÇÃO DO PERFIL CINÉTICO DA PRODUÇÃO DO FERMENTADO DE SERIGUELA EM REATOR SEM AGITAÇÃO



O crescimento celular para o processo em batelada sem agitação ocorreu de forma exponencial até as 12 horas de fermentação. Após este tempo, houve um decaimento do crescimento celular em função da morte das células presentes do meio. Das 22 às 24 horas de processo, houve um aumento de concentração celular. Isso pode ter sido ocasionado devido ao consumo de algumas frações de células, em fase de morte celular, por algumas células vivas ainda presentes no mosto, sendo assim utilizadas para multiplicação³⁴.

A diminuição do teor de açúcares presentes no mosto ocorre em função da atuação do microrganismo inoculado no meio, convertendo este substrato em etanol e dióxido de carbono. As análises de teor de sólidos solúveis expressos em °Brix para o processo realizado sem agitação mostraram que os valores permaneceram estáveis até as 8 horas de fermentação, e isso pode ter ocorrido provavelmente em decorrência da falta de homogeneização do sistema. A partir da décima hora, foi ocorrendo um decréscimo em função do tempo de fermentação, sendo observado um elevado desprendimento de gás carbônico no sistema do reator e, conseqüentemente, maior formação do produto. O processo fermentativo foi finalizado quando o mosto apresentou um valor constante de 6 °Brix, decorridas 88 horas de fermentação.

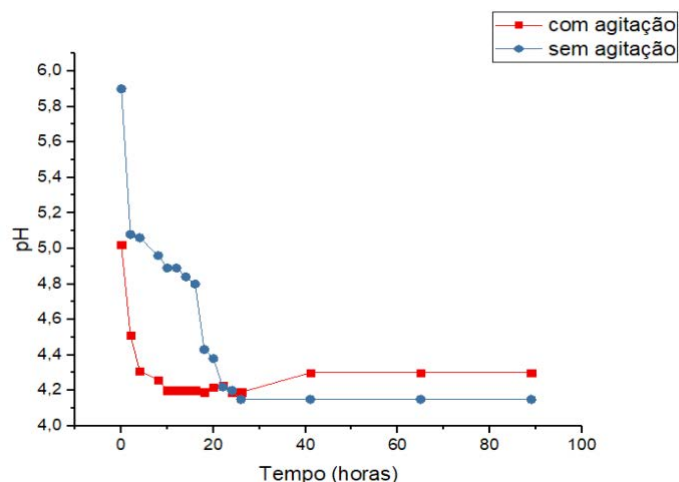
O teor alcoólico para o processo sem agitação apresentou-se constante até as 8 horas de processo fermentativo, possivelmente porque, durante esse período, o consumo de substrato do meio serviu para multiplicação celular e, conseqüentemente, não ocorreu geração de produto em quantidades que se pudesse quantificar. A produção de etanol iniciou na décima hora de fermentação, seguida de um acréscimo constante até o valor estabilizar em 8,78% ABV, no tempo de 24 horas.

Comparando-se os dois processos, representados nas Fig. 5 e 6, podemos verificar que, ao operar sem agitação, o consumo de substrato levou mais tempo para iniciar e, conseqüentemente, a formação do produto (etanol) também, diferenciando-se do processo ocorrido com agitação em que, nas primeiras horas, o substrato já estava sendo consumido e o produto gerado, mantendo-se constante ao longo do processo. Com relação ao crescimento celular, foi visto que, no processo com agitação, foi necessário um maior tempo até alcançar o ponto de máxima concentração de células (16 horas), diferenciando-se do processo ocorrido sem agitação, cujo pico ocorreu com 10 horas de processo.

Essas diferenças no tempo em que ocorrem o consumo de substrato, a formação de produto e o crescimento celular podem estar relacionadas a diferentes fatores, como o modo como o processo está sendo conduzido, a levedura utilizada no processo, o modo de preparo do mosto fermentativo, entre outras causas. Como neste trabalho foi utilizado o mesmo mosto com as mesmas características para os dois processos fermentativos, bem como a mesma levedura, fica evidenciado que a diferença ocorreu pelo modo como o processo foi conduzido, notando-se que o processo ocorrido com agitação apresentou um melhor desempenho com relação ao tempo gasto para a geração do produto.

Durante a coleta de dados para a obtenção dos parâmetros cinéticos, também se verificou o pH do meio reacional. Para processos fermentativos de frutas, valores de pH entre 3 e 5 são considerados bons para a qualidade do fermentado; e a faixa ótima, onde ocorre maior produção de etanol, está entre 4,5 e 5^{29,35}. Na Fig. 6, são apresentados os valores de pH, por tempo de fermentação, para os dois modos de operação.

FIGURA 6 – PH DO MOSTO DE MANGABA DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO, REALIZADO EM BATELADA COM E SEM AGITAÇÃO



Avaliando a Fig. 6, verifica-se que houve um decréscimo do pH seguido de uma estabilização dos valores em ambos os processos. Os valores de pH, ao final da fermentação, foram de 4,30 e 4,15, para os processos com agitação e sem agitação, respectivamente, sendo que estes valores se encontram dentro da faixa de pH considerados adequados para o desenvolvimento deste tipo de processo. Resultados semelhantes foram observados na obtenção de fermentado de ata (fruto conhecido como pinha), sendo observado um pH final variando de 4,07 a 4,19²⁹.

Podemos observar que, mesmo a faixa de pH do mosto estando fora do valor considerado ótimo para o crescimento da levedura, não ocorreu inibição do crescimento celular nos dois processos. Isso pode ter ocorrido devido à levedura utilizada no processo apresentar tolerância a valores de pH levemente mais ácidos, ou pode estar associado à existência de leveduras já presentes no mosto antes da inoculação²⁸.

PARÂMETROS CINÉTICOS DO PROCESSO FERMENTATIVO

Nas Tabelas 1 e 2, são apresentados os resultados obtidos com relação à concentração de etanol experimental (Q_e), concentração de etanol máxima teórica (Q_t), rendimento, produtividade e fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) para os dois tipos de reatores utilizados no processo fermentativo.

TABELA 1- CONCENTRAÇÃO TEÓRICA E EXPERIMENTAL DE ETANOL PARA OS DOIS REATORES

Q_e (g/L-1)	Q_t (g/L-1)
69,27	87,99

TABELA 2 – PARÂMETROS CINÉTICOS DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA PARA OS DOIS REATORES.

Processo	Rendimento (%)	Produtividade (g/L-1h-1)	YP/S
Com agitação	78,72	3,46	0,66
Sem agitação	78,72	2,88	0,66

Os valores de rendimento em produto observados para os processos de fermentação alcoólica de seriguela foram iguais para os dois reatores, sendo obtidos 78,72%. Estes valores de rendimentos indicam que aproximadamente 80% do açúcar disponível nos processos foram transformados em álcool etílico.

Já a produtividade, que expressa a quantidade de etanol produzido por hora, apresentou valores diferentes, de acordo com o modo de condução. No processo em batelada com agitação, a produtividade foi maior, sendo de 3,46 g.L⁻¹h⁻¹, enquanto na batelada sem agitação, o valor foi de 2,88 gL⁻¹h⁻¹. Um valor elevado para este parâmetro indica a produção de uma maior quantidade

etanol por hora, o que é vantajoso, visto que o processo pode ser encerrado mais rapidamente. Nesse estudo, foi observado que quanto maior o tempo de processo, menor a produtividade.

Pesquisadores estudaram a elaboração de um fermentado de melancia em um processo realizado em batelada e encontraram rendimento de 94% e produtividade de $1,65 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ ²⁵. Em outro estudo, pesquisadores produziram fermentado de morango em reator operando em batelada com agitação e obtiveram produtividade de $0,1336 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ ³⁶. Essas variações nos valores dos parâmetros cinéticos podem ser decorrentes de vários fatores, como levedura utilizada no processo, modo de operação do reator, temperatura, tempo de operação e substrato utilizado³⁷.

O rendimento em produto (YP/S), encontrado na fermentação de polpa de seriguela, foi igual a 0,66. Esse resultado pode ser explicado pela provável produção de outras substâncias como álcoois superiores, acetaldeídos e ésteres, também pela inibição das leveduras por causa do alto teor de etanol final no mosto fermentado e devido ao crescimento das leveduras, que consomem boa parte da sacarose existente no mosto.

O resultado obtido foi semelhante ao encontrado na produção do fermentado de melancia em reator operando em batelada, sendo obtido um rendimento em produto de 0,65²⁵. Já os resultados encontrados na elaboração do fermentado do fruto de mandacaru foram um pouco inferiores ao desse trabalho, sendo observado um rendimento em produto de 0,461³⁷.

Analisando os dados apresentados na Tabela 2, podemos afirmar que o processo de fermentação alcoólica que ocorreu de forma descontínua com agitação apresentou melhor desempenho em comparação ao processo que ocorreu no reator descontínuo sem agitação, visto que sua produtividade $3,46 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ foi superior. Esse resultado foi alcançado devido à duração do processo, sendo necessário menor tempo de operação, 20 horas, para produzir

8,78%ABV de etanol, enquanto no processo descontínuo sem agitação a duração foi de 24 horas, para produzir a mesma quantidade de etanol. Do ponto de vista econômico, levando em consideração a energia necessária para o funcionamento do reator com agitação, pode-se avaliar a possibilidade de escolher a utilização do processo em reator sem agitação, uma vez que o fermentado apresentou as mesmas características, sendo que a diferença de tempo necessário para isso foi de apenas 4 horas.

DESTILADO

Os produtos de ambos os processos fermentativos apresentados anteriormente foram misturados e o volume total foi utilizado para realização de um processo de bidestilação para obtenção da aguardente de seriguela. A bidestilação consiste em fazer duas destilações sucessivas para obtenção de um produto com maior qualidade e teor alcoólico desejado³⁸.

No início do processo, o fermentado com o teor alcoólico de 8,78% (v/v) e um volume de 3,20L passou pela primeira destilação obtendo-se um volume de 1L de destilado com uma graduação alcoólica de 25% em volume. Nessa primeira destilação, o teor alcoólico apresentou-se abaixo do valor mínimo exigido pela legislação brasileira vigente, publicado no Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009²², e apresentou uma cor azulada. Essa cor azulada é possivelmente ocasionada pela presença de cobre, material de construção da tubulação por onde o condensado é coletado, que é um dos compostos que mais desqualifica a bebida³⁸.

Foi realizada uma segunda destilação do volume de 1,0L para melhorar a qualidade da aguardente, separando-se as frações cabeça, coração e cauda. Foram coletados 10% iniciais, correspondentes à fração cabeça da destilação, equivalentes a 50,00 mL. A fração coração foi coletada até a obtenção da graduação alcoólica

desejada do destilado, sendo alcançado o teor de 41%, obtendo-se um volume de 520,00mL. O restante, correspondente à fração cauda do destilado, foi descartado. O destilado passou por um processo de filtração a vácuo para remoção de algumas partículas sólidas. Após a filtração, a aguardente obteve uma graduação alcoólica final de 40% (v/v) e apresentou a cor transparente, conforme pode ser visto na Fig. 7.

FIGURA 7—AGUARDENTE DE SERIGUELA COM GRADUAÇÃO ALCÓOLICA DE 40% (v/v), OBTIDA NO PROCESSO DE BIDESTILAÇÃO



Os resultados apresentados mostraram que a aguardente produzida apresentou teor alcoólico dentro dos parâmetros exigidos pela legislação brasileira de bebidas²³. Valores semelhantes foram encontrados em outros trabalhos de fermentação alcoólica de frutos seguida da destilação. Para a aguardente obtida a partir

da algaroba, a graduação alcoólica foi de 40%ABV, mesmo valor obtido neste estudo³⁹. Estudando a destilação do fermentado do abacaxi, pesquisadores alcançaram uma concentração alcoólica de 43%ABV, utilizado um volume de fermentado de 13,5L e uma graduação alcoólica inicial do fermentado de 9,6%ABV⁴⁰. O valor de 45%ABV foi encontrado para o destilado de carambola⁴¹. Estes resultados evidenciam a possibilidade de aplicar os processos de fermentação e destilação para obtenção de produtos com valor agregado.

CONCLUSÃO

Os fermentados de seriguela obtidos utilizando os dois diferentes reatores operados em batelada, com e sem agitação, apresentaram o mesmo teor alcoólico: 8,78%ABV. Com isso, pode-se afirmar que, independentemente da agitação do meio, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada é adequada para o processo de fermentação alcoólica do mosto de seriguela.

Os rendimentos para os dois processos foram iguais e altos, alcançando-se o mesmo valor, de 78,72%. As produtividades foram diferentes, sendo obtido valores de 3,36 gL⁻¹h⁻¹ e 2,88 gL⁻¹h⁻¹, para os processos com e sem agitação, respectivamente, evidenciando que o processo com agitação permite alcançar um produto com graduação alcoólica maior, se o tempo de processo for fixado.

A bidestilação do fermentado de seriguela proporcionou a produção da aguardente de seriguela com 40% de graduação alcoólica, sendo que este valor se encontra dentro dos limites exigidos pela legislação vigente, proporcionando um meio de aproveitar o fruto gerando um produto de valor agregado.

REFERÊNCIAS

1. Paula B. Produção de fermentado de umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.). [Dissertação]. Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2011. 87F
2. Araújo FP. Potencialidades de fruteiras da caatinga. Anais da XXVII reunião nordestina de botânica. 2004, Petrolina – PE, Brasil, 57-61.
3. Sousa RP, Filgueiras HAC, Costa JTA, Alves REA, Oliveira AC. Armazenamento da ciriguela (*Spondias purpurea* L.) sob atmosfera modificada e refrigeração. Revista Brasileira de Fruticultura. 2000; 22(1):334-6.
4. Díaz-Pérez JC, Zavaleta R, Bautista S, Sebastián V. Cambios físico-químico de ciruela mexicana (*Spondias purpurea* L.) cosechada en dos diferentes estados de madurez. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha. 1998; 1:20-6.
5. Soares AAJ. Avaliação Físico-Química e Bromatológica da Polpa de *Spondias purpurea* L (ciriguela) na Região do Semiárido Central Paraibano. [Dissertação] [Campina Grande (PB)]. Universidade Federal de Campina Grande; 2011. 65p.
6. Filgueiras HAC, Alves RE, Moura CFH, Oliveira, AC, Araújo NCC. Calidad de frutas nativas de latinoamerica para procesamiento: ciruela mexicana (*Spondias purpurea* L.). Anais da Reunion anual de la sociedad interamericana de horticultura tropical; 1999; Lima, Peru; 1999. 52p.
7. Filgueiras HAC, Moura CFH, Alves RE. Caracterização de frutas nativas da América Latina. Cap. 7 Cirigüela (*Spondias purpurea* L.). DONADIO, L.C. (ed.). Jaboticabal: Funep, 2000. 27p.
8. Silva QJ, Moreira ACCG, Melo EA, Lima, VLAG. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de genótipos de ciriguela (*Spondias purpurea* L.). Alimentos e Nutrição. 2012 jan./mar; 23(1):73-8.
9. Silva QJ. Caracterização de frutos de genótipos de ciriguela (*Spondias purpurea* L.) [Dissertação] [Recife (PE)], Universidade Estadual Rural de Pernambuco; 2011. 107p.
10. Fagundes DTO, Silveira MLR, Santos CO, Sautter CK, Penna NG. Fermentado alcoólico de fruta: uma revisão. Anais do 5º Simpósio de Segurança alimentar Alimentação e Saúde; 2015 26 a 29 de maio; Rio Grande do Sul, 23p.
11. Aidoo KE, Rob Nout MJ, Sarkar PK. Occurrence and function of yeasts in Asian indigenous fermented foods. FEMS Yeast research. 2006; 6(1):30-10.
12. Santos ACMD, Matos CRL de, Neto JG, Santos LR dos. Produção de vinhos. [Relatório]. [Belém (PA)]: UFPA, 2011.

13. Andrietta SR. Apostila do Curso de Engenharia de Fermentação; 2007 p. 71; 99.
14. Schmidell W, Lima UA, Aquarone E, Borzani W. Biotecnologia Industrial, Volume 2, Engenharia Bioquímica, 1a ed., São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda., 2001, 541 p.
15. Lara, CA. Produção de Aguardente de Banana com utilização de Enzimas Pectinolíticas. [Dissertação]. [Belo Horizonte (MG)]: Faculdade de Farmácia – UFMG, 2007. 77p.
16. Brasil, Decreto nº2314, 4 set. 1997, Diário Oficial da União, Brasília, 05 de set., 1997.
17. Janzantti NS. Compostos voláteis e qualidade de sabor de cachaça. [Tese]. [Campinas (SP)]: Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 2004. 179 p.
18. Garcia-Llobodanin L. Potential of Blanquilla pear variety to produce pear spirits: Influence of the fermentation and distillation conditions in the final quality. [Tese]. [Espanha]: Universitat Rovira i Virgili Spain, 2008. 187 p.
19. Silva MC, Azevedo LC de, Carvalho MM de, Sá, AGB de, Lima MS. Produção e avaliação de aguardente de manga envelhecida com chips de carvalho francês e umburana de cheiro. Anais do congresso de pesquisa e inovação da rede norte nordeste de educação tecnológica; 2011; Maceió (AL).
20. Lima, I. L. A.; filho, a. B. M. Técnico em alimentos: tecnologia de bebidas. Recife: EDUFRPE; 2011. 126 p.
21. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 13, de 29 de junho de 2005.
22. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009.
23. Bruch, KL. Nem tudo que fermenta vira VINHO. Bento Gonçalves: IBRAVIN; 2012. 24p.
24. Neves LCM. Obtenção da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase utilizando *Saccharomyces cerevisiae* W303-181. [Dissertação]. [São Paulo (SP)]: Universidade de São Paulo; 2003. 284p.
25. Fontan RCI. Cinética Da Fermentação Alcoólica na Elaboração de Vinho de Melancia. CEPPA. 2011 jul/ dez; 29(2):203-8.
26. Pocock KF, Salazar FN, Waters EJ. The effect of bentonite fining at different stages of white winemaking on protein stability. Australian journal of grape and wine research. 2011; 17(2):280-5.
27. Filho MTL, Perreira EM, Florentino ER, Mata MERM, Pereira BBM. Comportamento cinético do fermentado alcoólico de banana prata (*musa ssp*) frente a diferentes parâmetros. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável. 2015 out-dez; 10(4):26-4.

28. Lopes ACA, Pinto IO, Souza CM, Cangussu ASR, Oliveira MES. Cinética de crescimento de levedura em mosto de cagaita para produção de bebida fermentada. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*. 2015 jul-set; 10(3):6-5.
29. Muniz CR, Borges MF, Abreu FAP, Nassu RT, Freitas, CAS. Bebidas fermentadas a partir de frutos tropicais. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos (CEPPA)*. 2002; 20 (2): 309-13.
30. Melo JRM, Bueno MR, Cavalcanti ADD, Marques RG. Estudo Cinético e Caracterização da Fermentação Alcoólica de Uvas dos Cultivares Niágara. *Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, 2014, Florianópolis (SC).
31. Oliveira ER. Desenvolvimento de bebida alcóolica fermentada à base de jambolão e caldo de cana-de-açúcar. [Dissertação]. [Goiânia(GO)]: Universidade Federal de Goiás; 2015.146p.
32. Asquieri ER, Damiane C, Candido MA, Assis EM. Vino de jabuticaba (*Myrciaria clauriflora* Berg): Estudio de las características físico-químicas y sensoriales de los vinos tinto seco y dulce, fabricado con la fruta integral. *Alimentaria*. 2004; 355(1):111-12.
33. Dias DR, Schwan RF, Lima LC. Metodologia para elaboração de fermentado de cajá (*Spondias mombin* L). *Cienc. Tecnol. Aliment.* 2003; 23(3):342-9.
34. Brito AFS. Análise cinética e estudo dos parâmetros fermentativos para a produção de hidromel. [Trabalho de Conclusão de Curso]. [Sumé (PB)]: Universidade Federal de Campina Grande; 2015.
35. Arruda AR, Casimiro ARS, Garruti, D. S; Abreu FAP. Caracterização físico-química e avaliação sensorial de bebida fermentada alcoólica de banana. *Revista ciência agrônômica*. 2007; 38 (4): 377-8.
36. Andrade, M.B., Perim, G.A., Santos, T.R.T., Marques, R.G. 2013. Fermentação Alcoólica e Caracterização de Fermentado de Morango. *BBR- Biochemistry and Biotechnology Reports*, 2, 265-4.
37. Almeida MM, Tavares DPSA, Rocha AS, Oliveira LSC, Silva FLH, Mota JC. Cinética da produção do fermentado do fruto do mandacaru. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*. 2006; 8 (1): 35-8.
38. Rocha, A.S. Produção E Avaliação Físico-Química Da Aguardente Do Frutoda Palma Forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill). [Dissertação]. [Campina Grande (PB)]: Universidade Federal de Campina Grande: 2008.76p.
39. Silva DPD, Souza JP de, Cavalcanti RMF, Costa LC da, Souza BRS de, Brito AFS, Queiroz, JCF de. Produção artesanal de aguardente a partir de algaroba (*Prosopis juliflora*) e sua aceitação por consumidores. *Revista Saúde & Ciência Online*. 2014;3(3):329-11.
40. Nunes BRP. Estudos da produção de aguardente de abacaxi. [Relatório de Iniciação Científica]. [Campina

Grande (PB)]: Universidade Federal de Campina Grande;
2007

41. Moreira TL, Aguiar-Oliveira E, Kamimura ES, Maldonado RR. Produção de Aguardente de Carambola. Anais do 7°. Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP; Matão (SP); 2016.

CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE MYRACRODRUON URUNDEUVA (AROEIRA-DO-SERTÃO) E POTENCIAL ANTIOXIDANTE

Dayse Pereira Dias Silva

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Faculdade de Farmácia
Porto Alegre – RS – daysepds@gmail.com

Lucas Silva Abreu

Universidade Federal da Paraíba – Centro de Ciências da Saúde
João Pessoa – PB – lucas.abreu@ltf.ufpb.br

Yuri Mangueira do Nascimento

Universidade Federal da Paraíba
João Pessoa – PB – yurimangueira@ltf.ufpb.br

Natasha Lorena Ferreira da Silva Leal

Universidade Federal do Rio Grande do Norte – Centro de Ciências da Saúde
Natal-RN – natashalorena@gmail.com

Marcelo Sobral da Silva

Universidade Federal da Paraíba – Centro de Ciências da Saúde
João Pessoa – PB – marcelosobral.ufpb@gmail.com

Alecksandra Vieira de Lacerda

Universidade Federal de Campina Grande – Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido
Sumé – PB – alecvieira@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais data da época das sagradas escrituras e do Papiro de Ebers, que descreve inúmeras drogas de origem vegetal e animal¹. A papoula (*Papaver somniferum*) é um exemplo desses registros de espécie, apresentando poder analgésico e tendo como princípio ativo a morfina². Após a elucidação

estrutural da morfina, diversos outros compostos foram descobertos, como vimblastina (velban®) e vincristina (Oncovin®), extraídas da *Catharrantus roseus*; e taxol, extraído da casca da *Taxus brevifolia*, exemplos de quimioterápicos para o tratamento do câncer³.

Apesar de existirem outros métodos de descoberta de medicamentos, os produtos naturais ainda se mostram bastante promissores na busca por novas drogas. Nos últimos 34 anos (1981-2014), 30% dos medicamentos utilizados em países industrializados são obtidos de plantas ou derivados dos metabólitos secundários das plantas. Por exemplo, dos medicamentos anticancerígenos aprovados, 49% são obtidos de produtos naturais ou derivados diretamente destes⁴.

A caatinga apresenta-se como uma fonte promissora para a descoberta de novos produtos naturais, visto que é um bioma exclusivamente brasileiro, ou seja, a maior parte do seu patrimônio biológico não é visto em nenhum outro lugar do planeta⁵. A caatinga é extremamente heterogênea, os contrastes físicos e climáticos propiciam o aparecimento de diferentes tipos de formações vegetais. É tachada como um ambiente pobre em espécies e com baixo grau de endemismo, o que certamente é reflexo do pouco conhecimento sobre a região⁶. A enorme variabilidade presente nesse bioma e a escassez de estudos nos fazem pensar que regiões menos exploradas ou inexploradas podem estar associadas a novas entidades químicas⁷.

A *Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão, pertencente à família *Anacardiaceae*, é conhecida vulgarmente no Brasil por urundeúva, aroeira, aroeira-preta, aroeira do cerrado, aroeira-do-sertão, entre outros. Na caatinga, esta árvore atinge de 5 a 20m de altura e cerca de 30 a 60cm de DAP (diâmetro a altura do peito). No Brasil, a sua ocorrência natural se dá nos estados do Ceará e São Paulo e está presente em todos os estados do Nordeste, além dos estados do Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Tocantins e Distrito Federal⁸.

Estudos fitoquímicos da *M. urundeuva* mostraram a presença de chalconas diméricas e taninos⁹, chalconas diméricas denominadas Urundeuquina A, B e C¹⁰, além de componentes voláteis como monoterpenos (*Z*)- β -ocimeno e Δ^3 -careno, limoneno, mirceno, α -pineno e (*E*)- β -Ocimeno¹¹ e uma grande quantidade de compostos fenólicos presentes nas cascas¹².

Bastante utilizada na medicina popular, é considerada uma das principais plantas medicinais da região Nordeste, sendo indicada como anti-inflamatória, cicatrizante no tratamento de feridas, em úlceras gástricas, vaginites e hemorroidas¹³. Alguns estudos vêm sendo realizados a fim de identificar e compreender as suas propriedades farmacológicas e aplicação no tratamento de diversas doenças, confirmando seu uso pela medicina popular.

Diante disso, torna-se necessário que estudos sobre a composição química de plantas medicinais sejam realizados na busca por novos compostos, a fim de contribuir para um melhor aprofundamento do conhecimento químico da espécie *Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão. Logo, este trabalho teve como objetivo identificar a composição química por Espectrometria de Massas, propor a fragmentação destes compostos identificados e avaliar a atividade antioxidante e a determinação do teor de fenóis totais da espécie coletada na região da caatinga no Cariri Paraibano.

METODOLOGIA

OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO, TRITURAÇÃO E EXTRAÇÃO POR SOLVENTE

As cascas de *M. urundeuva* foram coletadas na zona rural do município de Serra Branca-Paraíba região que envolve o bioma Caatinga, a fim de caracterizar os metabólitos secundários presentes. As cascas foram acondicionadas em sacos plásticos com

identificação do local e data. As amostras vegetais foram lavadas em água corrente e secas em estufa com recirculação de ar a 45 °C durante 72 h. Uma exsiccata foi depositada no Herbário Lauro Pires Xavier – JPB da Universidade Federal da Paraíba sob o código JPB 36081.

Após seco, o material foi submetido à trituração em forrageira, obtendo-se 2.22 kg de pó vegetal. Posteriormente, o pó vegetal das cascas de *M. urundeuva* foi macerado com etanol (EtOH) a 95%, em recipiente de aço inoxidável, por 120 horas para a primeira extração; e 72 horas nas duas extrações seguintes, realizadas a fim de obter uma maceração exaustiva. A solução extrativa obtida foi concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40°C para obtenção do Extrato Etanólico Bruto (EEB). Em seguida, 5g do EEB foram dissolvidos em 100mL de metanol (MeOH) e 100 mL de hexano para obtenção de uma solução metanólica e hexânica, respectivamente, sob agitação mecânica para dissolução total¹⁴.

ANÁLISES EM CLAE-IES-EM/EM

A caracterização dos constituintes químicos foi realizada por Espectrometria de Massas (EM) de baixa resolução: 1mg da solução metanólica foi solubilizada em 1mL de MeOH. Posteriormente a amostra foi filtrada com filtro PVDF de 0,45 µm e analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). As análises de CLAE-IES-EM/EM foram realizadas utilizando um UFLC (Shimadzu®), com detector de arranjo de diodo (DAD) SPD-M20A acoplado a um Espectrômetro de Massas com ionização por eletrospray e analisador do tipo “Ion trap” (AmazOn X–Bruker®), em modo negativo.

Para a separação cromatográfica, utilizou-se uma coluna de fase reversa C18 (Kromasil; 250 mm x 4,6 mm x 5 micrómetros) com gradiente de eluição: solvente A (água Mili-Q® e ácido fó-

mico a 0,1% v/v) e solvente B (metanol). O volume de injeção foi de 20 µL e fluxo de solvente de 0,6mL/min.

POTENCIAL ANTIOXIDANTE E TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS

DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE IN VITRO: MÉTODO DE SEQUESTRO DO RADICAL LIVRE 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZILA (DPPH)

Realizou-se com base no método descrito na literatura,¹⁵ com adaptações. Foi utilizado 1mg de EEB diluído em MeOH, com concentrações entre 15 e 27 µg/mL, todas em triplicata. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-Visível (UV-2550, Shimadzu) em comprimento de onda de 517 nm. A determinação da porcentagem de atividade antioxidante (%AA) foi feita através da Equação 1:

$$\% \text{ de AA} = Ac \frac{Ac - (Aa - Ab)}{Ac} \times 100$$

Em que:

Ac: Absorbância do controle negativo;

Aa: Absorbância da amostra;

Ab: Absorbância do branco.

Para o cálculo da CI_{50} , utilizou-se a equação da reta, em que foi substituído o valor de y por 50 para obtenção da amostra com capacidade de reduzir em 50% o DPPH. A substância referência/padrão utilizada foi o ácido ascórbico.

TEOR DE FENÓIS TOTAIS

A quantificação de fenóis totais foi realizada pelo método Folin-Ciocalteu a 10%, com adaptações¹⁶: 1mg do EEB foi utilizado e diluído em solução hidrometanólica (1:1 v/v) e realizaram-se as

diluições para as concentrações escolhidas de 90, 135 e 150 µg/mL. A leitura foi realizada usando o equipamento espectrofotômetro UV-Visível (UV-2550, Shimadzu) com comprimento de onda em 765nm.

A curva de calibração foi preparada com a solução padrão de ácido gálico, nas concentrações de 7,5 a 150 µg/mL. Por meio da equação de regressão linear da curva de calibração calculou-se o teor de fenóis totais. Em que y representa a absorbância medida e x representa a concentração de equivalentes de Ácido Gálico, sendo expressa em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/ g de amostra).

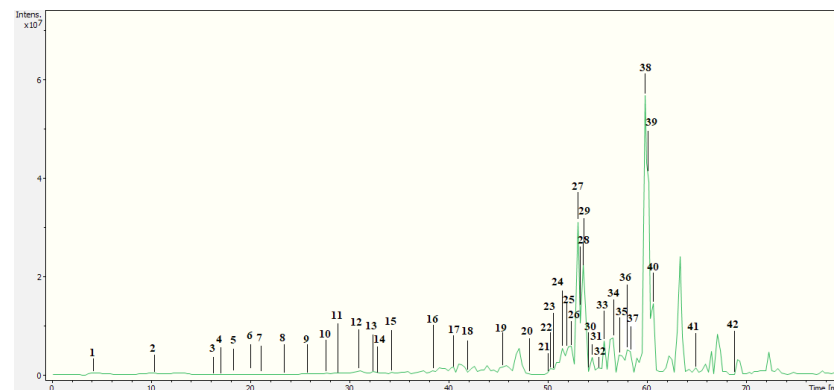
RESULTADOS E DISCUSSÃO

CARACTERIZAÇÕES DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DO EXTRATO METANÓLICO DAS CASCAS DE MYRACRODRUON URUNDEUVA POR CLAE-IES-EM/EM

A caracterização dos constituintes químicos do extrato metanólico das cascas de *M. urundeuva* foram analisadas por CLAE-IES-EM/EM. Na Fig. 1, está representado o cromatograma dos íons identificados, obtido por Ionização por *Eletrospray* no modo negativo (IES-). Os compostos foram identificados com base nos padrões de fragmentação obtidos por espectrometria de massas de baixa resolução e comparados com dados na literatura, sendo desta forma possível sugerir putativamente a estrutura de 42 compostos. No Quadro 1, estão representados os dados de Tempo de retenção (Tr), fórmula molecular, massa molecular (MS), massa dos fragmentos (MS/MS) dos compostos identificados por CLAEIES-MS/MS do extrato das cascas de *M. urundeuva*. Os números entre parênteses, presentes na coluna do Tr, referem-se à identificação

dos picos para cada substância identificada no cromatograma da Fig. 1, mostrando todas as substâncias identificadas no tempo de 0 min a 70 min.

FIGURA 1— CROMATOGRAMA DE ÍONS TOTAIS IDENTIFICADOS OBTIDO POR IES NO MODO NEGATIVO COM IDENTIFICAÇÃO DOS PICOS CORRESPONDENTES AOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS



QUADRO 1—COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR CLAE-IES-EM/EM DO EXTRATO METANÓLICO DAS CASCAS DO CAULE DE MYRACRODRUON URUNDEUVA

Tempo de retenção (Tr) [M-H]-(min)/ (Pico)	Fragmentos MS/MS (%)	Fórmula molecular	Substância sugerida	Referência
4.3 (1)	MS2: 483 (65); 465 (100); 423 (19); 313 (22); 271 (8); 235 (4); 169 (5)	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	Trigaloil Glicose	17; 18
10.5 (2)	125 (5)	C ₇ H ₆ O ₅	Ácido gálico	17; 19
16.4 (3)	MS2: 331 (54); 313 (100); 271 (92); 211 (73); 169 (18)	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	Digaloil Glicose	17; 18; 19
17.3 (4)	MS2: 331 (56); 313 (57); 271 (100); 211 (19) / MS3: 169 (100)	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	Digaloil Glicose isômero I	17; 18; 19

Tempo de retenção (Tr) [M-H]- (min)/ (Pico)	Fragmentos MS/MS (%)	Fórmula molecular	Substância sugerida	Referência
18.4 (5)	483 MS2: 331 (84); 313 (67); 271 (100); 211 (42); / MS3: 169 (100)	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	Digaloil Glicose isômero II	17; 18;19
20.0 (6)	483 MS2: 331 (100); 313 (57); 271 (75); 211 (48); / MS3: 169 (100)	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	Digaloil Glicose isômero III	17; 18;19
21.2 (7)	483 MS2: 331 (84); 313 (55); 271 (100); 211 (51); / MS3: 169 (100)	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	Digaloil Glicose isômero IV	17; 18;19
23.7 (8)	483 MS2: 331 (67); 313 (100); 271 (49); 211 (22); / MS3: 169 (100)	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	Digaloil Glicose isômero V	17; 18;19
25.8 (9)	483 MS2: 331 (47); 313 (100); 271 (49); 211 (31); / MS3: 169 (100)	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	Digaloil glicose isômero VI	17; 18;19
27.8 (10)	483 MS2: 331 (47); 313 (73); 271 (100); 211 (33); 169 (22)	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	Digaloil Glicose isômero VII	17; 18;19
29.1 (11)	635 MS2: 483 (89); 465 (100); 423 (43); 313 (38); 271 (25); 235 (5); 169 (22)	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	Trigaloil Glicose isômero I	17; 18
31.1 (12)	483 MS2: 331 (4); 313 (13); 271 (12); 169 (4)	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	Digaloil Glicose isômero VIII	17; 18;19
32.4 (13)	483 MS2: 331 (2); 313 (8); 271 (8);	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	Digaloil Glicose Isômero IV	17; 18;19
32.8 (14)	635 MS2: 483 (40); 465 (100); 423 (13); 313 (14); 169 (6)	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	Trigaloil Glicose isômero II	17; 18

Tempo de retenção (Tr) [M-H]- (min)/ (Pico)	Fragmentos MS/MS (%)	Fórmula molecular	Substância sugerida	Referência
34.3 (15)	635 MS2: 483 (39); 465 (100); 423 (72); 313 (20); 271 (12); 169 (25)	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	Trigaloil Glicose isômero III	17; 18
38.4 (16)	441 MS2: 289 (100); 245 (12) 137 (20)	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	Catequin galato	18;20
40.5 (17)	197 MS2: 169 (7); 124 (2)	C ₉ H ₁₀ O ₅	Galato de etila	18
42.0 (18)	441 MS2: 289 (100)	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	Catequin galato isômero I	18;20
45.5 (19)	515 MS2: 353 (100); 335 (12); 300 (1); 191 (88)	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	Dicafeoil ácido químico	21;22
48.1 (20)	523 MS2: 413 (17); 387 (100); 251 (9)	C ₃₀ H ₂₀ O ₉	Urundevina B ou D ou F	17
50.0 (21)	539 MS2: 521 (8); 403 (100); 385 (58); 293 (15); 267 (8); 251 (7)	C ₃₀ H ₂₀ O ₁₀	Urundevina E ou H	17
50.3 (22)	515 MS2: 353 (100); 335 (5); 300 (11); 191(2)	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	Dicafeoil ácido químico isômero I	21;22
50.7 (23)	523 MS2: 413 (17); 387 (41); 251 (10)	C ₃₀ H ₂₀ O ₉	Urundevina B ou D ou F isômero I	17
51.5 (24)	539 MS2: 521 (4); 403 (100); 293 (7); / MS3: 267 (100)	C ₃₀ H ₂₀ O ₁₀	Urundevina E ou H isômero I	17
52.1 (25)	541 MS2: 523 (26); 413 (8); 405 (100); 387 (85); 251 (3)	C ₃₀ H ₂₂ O ₁₀	Urundevina G	17
52.4 (26)	300 MS2: 283 (31); 256 (100); 229 (71); 185 (37); 173 (3)	C ₁₄ H ₆ O ₈	Ácido elágico	18

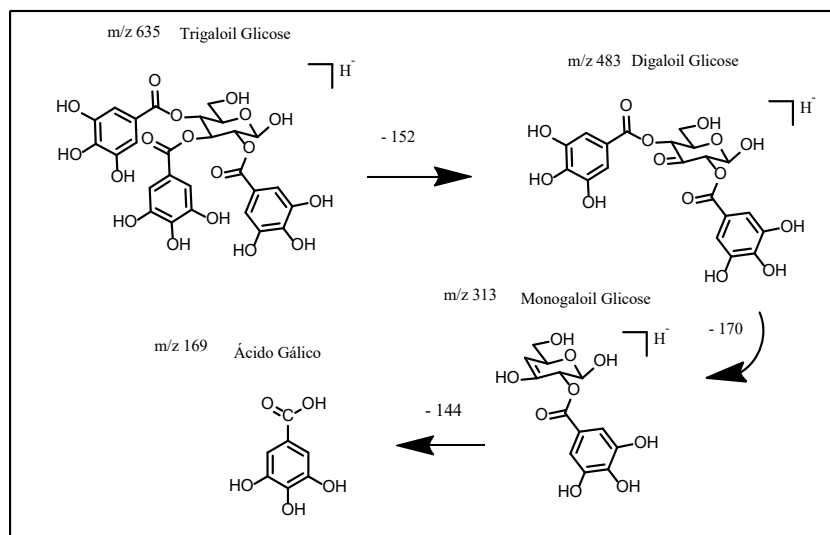
Tempo de retenção (Tr) [M-H]- (min)/ (Pico)	Fragmentos MS/MS (%)	Fórmula molecular	Substância sugerida	Referência
53.1 (27)	541 MS2: 523 (23); 413 (11); 405 (100); 387 (56); 251 (2)	C ₃₀ H ₂₂ O ₁₀	Urundevina G isômero I	17
53.3 (28)	525 MS2: 507 (20); 431 (11); 415 (37); 389 (100); 371 (73); 353 (26); 237 (42)	C ₃₀ H ₂₂ O ₉	Matosina ou Urundevina J	17
53.7 (29)	539 MS2: 521 (1); 403 (72); 387 (100); 267 (1); 251 (26)	C ₃₀ H ₂₀ O ₁₀	Urundevina E ou H isômero II	17
54.1 (30)	523 MS2: 413 (28); 387 (100); 369 (8); 251(11)	C ₃₀ H ₂₀ O ₉	Urundevina B ou D ou F isômero II	17
54.5 (31)	525 MS2: 507 (15); 431 (5); 415 (40); 389 (100); 371 (64); 353 (27); 237 (2)	C ₃₀ H ₂₂ O ₉	Matosina ou Urundevina J isômero I	17
55.1 (32)	541 MS2: 523 (6); 413 (5); 405 (37); 387 (16); 251 (2)	C ₃₀ H ₂₂ O ₁₀	Urundevina G isômero II	17
55.7 (33)	525 MS2: 507 (21); 431 (11); 415 (44); 389 (100); 371 (32); 353 (2); 237 (47)	C ₃₀ H ₂₂ O ₉	Matosina ou Urundevina J isômero II	17
56.6 (34)	541 MS2: 523 (80); 413 (24); 405 (100); 387 (61); 251 (1)	C ₃₀ H ₂₂ O ₁₀	Urundevina G isômero III	17
57.2 (35)	525 MS2: 507 (22); 431 (13); 415 (44); 389 (100); 371 (46); 353 (39); 237 (48)	C ₃₀ H ₂₂ O ₉	Matosina ou Urundevina J isômero III	17
58.1 (36)	541 MS2: 523 (29); 413 (11); 405 (100); 387 (63); 251 (3)	C ₃₀ H ₂₂ O ₁₀	Urundevina G isômero IV	17
58.4 (37)	525 MS2: 507 (100); 431 (83); 415 (58); 389 (43); 371 (36); 353 (2)	C ₃₀ H ₂₂ O ₉	Matosina ou Urundevina J isômero IV	17

Tempo de retenção (Tr) [M-H]- (min)/ (Pico)	Fragmentos MS/MS (%)	Fórmula molecular	Substância sugerida	Referência
59.9 (38)	525 MS2: 507 (19); 431 (13); 415 (44); 389 (100); 371 (30)	C ₃₀ H ₂₂ O ₉	Matosina ou Urundevina J isômero V	17
60.0 (39)	523 MS2: 413 (18); 387 (100); 251 (14)	C ₃₀ H ₂₀ O ₉	Urundevina B ou D ou F isômero III	17
60.7 (40)	525 MS2: 507 (18); 431 (7); 415 (45); 389 (100); 371 (67)	C ₃₀ H ₂₂ O ₉	Matosina ou Urundevina J isômero VI	17
64.9 (41)	539 MS2: 521 (2); 429 (17); 403 (90); 385 (5) ;/ MS3: 267 (100); 251 (2)	C ₃₀ H ₂₀ O ₁₀	Urundevina E ou H isômero III	17
68.9 (42)	523 MS2: 413 (6); 387 (100); 251 (3)	C ₃₀ H ₂₀ O ₉	Urundevina B ou D ou F isômero IV	17

Na primeira coluna, os números entre parênteses referem-se aos picos no cromatograma da Fig. 1.

O Composto **1**, com Tr em 4,3 min, foi identificado de acordo com o pico do íon molecular desprotonado em m/z 635 [M-H]. Os dados da literatura sugerem nesta massa a estrutura do Trigaloil glicose^{17,18}, tendo como principais fragmentos gerados a partir do pico íon base, em m/z 483, 313 e o fragmento 169 gerado a partir do íon em m/z 465 correspondentes a perdas neutras e consecutivas de unidades de galoil (152 Da) e galato. A proposta foi justificada por meio da reação de Rearranjo Remoto de Hidrogênio a partir do íon 635 para perdas de unidades de galoil, e o fragmento em 169 justificado pela perda da unidade glicosídica de 144 a partir do fragmento em 313. A proposta de fragmentação está representada na Fig. 2. Os compostos **11** (Tr 29,1 min), **14** (Tr 32,8 min) e **15** (Tr 34,3 min) foram considerados isômeros do Composto **1**, apresentando o mesmo íon molecular e mesma proposta de fragmentação.

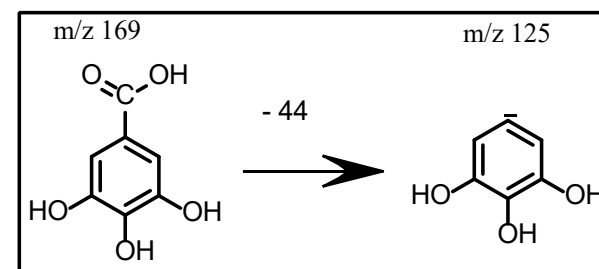
FIGURA 2 – MOLÉCULA DESPROTONADA



Na Fig. 2, observamos ainda o fragmento 3 apresentando uma molécula desprotonada em m/z 483 [M-H]⁻ correspondente a um Digaloil^{17;18;19}, e sua fragmentação com perdas neutras e unidades de galato (170 Da) gerando o Monogaloil Glicose em m/z 313 [M-H]⁻, formando por fim o ácido gálico em m/z 169 [M-H]⁻. Os Compostos de 4 (Tr 17,3 min) a 10 (Tr 27,8 min), 12 (Tr 31,1 min), 13 (Tr 32,4 min) foram identificados como isômeros do Composto 3, apresentando a mesma fragmentação em m/z 483.

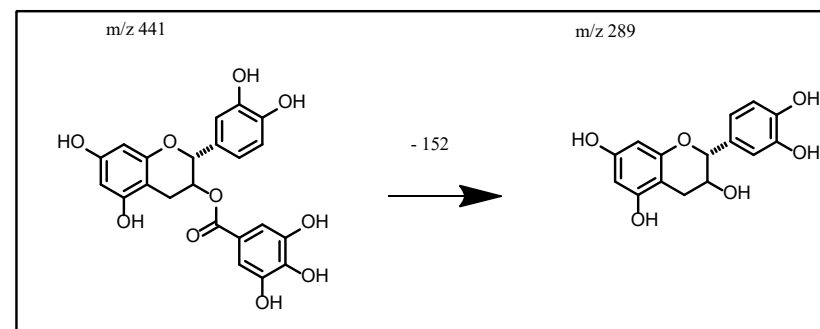
O Composto 2 no Tr, em 10,5 min, apresentou espectro de massas com pico do íon molecular desprotonado em m/z 169 [M-H]⁻. Pesquisas na literatura sugerem a estrutura como sendo o ácido gálico. A sugestão foi realizada de acordo com a fragmentação formada a partir do íon base, apresentando íon fragmento em m/z 125 formado pela perda de CO₂^{17;18}. A proposta de fragmentação está representada na Fig. 3.

FIGURA 3 – PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO DO ÍON EM M/Z 169



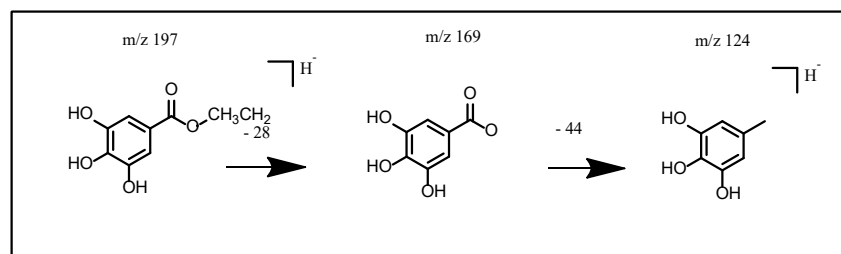
O Composto 16 no Tr, em 38,4min, apresentou espectro de massas com o pico do íon molecular desprotonado em m/z 441 [M-H]⁻. De acordo com a literatura, sugerimos putativamente que a estrutura é consistente com o Catequin galato; pelo padrão de fragmentação, apresentou o íon em m/z 289 a partir do íon base, com perda de uma unidade de galiol explicado a partir de uma reação de Rearranjo Remoto de Hidrogênio, como representado na Fig. 4. O Composto 18 no Tr, em 42,0min, foi identificado como isômero do Composto 16, apresentando o mesmo íon em m/z 441 e mesma fragmentação, corroborando os dados da literatura^{18;20}.

FIGURA 4 – PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO DO ÍON EM M/Z 441



O composto 17 no Tr, em 40,5 min, apresentou um espectro de massas com o pico do íon molecular desprotonado em m/z 197 $[M-H]^-$. De acordo com a literatura, sugerimos putativamente que a estrutura consiste com o Galato de Etila, o padrão de fragmentação apresentou íon em m/z 169 a partir do íon base, com perda de um grupo etil explicado a partir de uma reação de Rearranjo Remoto de Hidrogênio, e o íon 124 originado a partir do fragmento 169 com perda de uma unidade de CO_2 , como representado na Fig. 5, corroborando assim os dados presente na literatura¹⁸.

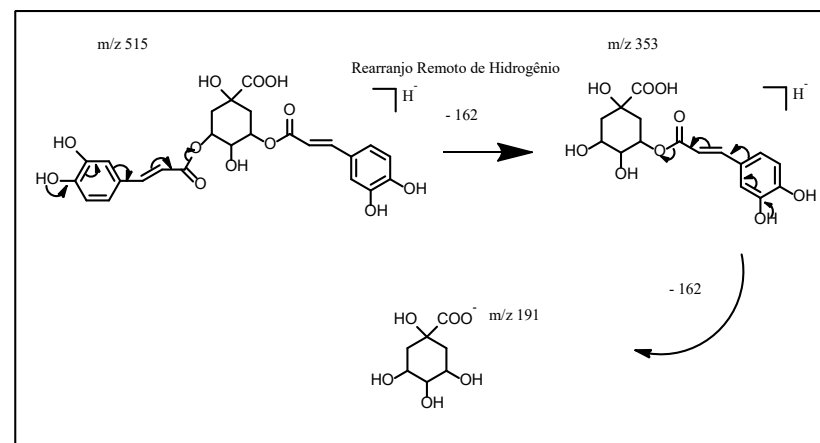
FIGURA 5—PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO DO ÍON EM M/Z 197



O Composto 19 no Tr, em 45,5 min, apresentou um espectro de massas com o pico do íon molecular desprotonado em m/z 515 $[M-H]^-$. De acordo com a literatura, sugerimos putativamente que a estrutura consiste com o Dicafeoil Ácido Químico, de acordo com o padrão de fragmentação, que apresentou o íon em m/z 353 a partir do íon base, com perda de um grupo de ácido cafeico $[M-H-162]$ explicado a partir de uma reação de Rearranjo Remoto de Hidrogênio, seguido de outra perda do grupo de ácido cafeico $[M-H-162]$ também explicada por uma reação de rearranjo remoto de hidrogênio, gerando o íon da molécula desprotonada em m/z 191 (Fig. 6), corroborando os dados da literatura^{21,22}. O Composto 22 com Tr em 50,3 foi considerado isômero do Composto

19, pois apresentou mesmo íon em m/z 515 e mesmo padrão de fragmentação.

FIGURA 6 – PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO DO ÍON EM M/Z 515



O Composto 20 no Tr 48,1 min apresentou um espectro de massas com o pico do íon molecular desprotonado em m/z 523 $[M-H]^-$. De acordo com a literatura¹⁷, a estrutura pode ser consistente com a de uma Urundevina B ou D ou F. Não foi possível afirmar a quais substâncias refere-se a estrutura encontrada neste trabalho, visto que na literatura existem três compostos com estruturas que apresentam a massa de 523 e fragmentação em comum, logo seria necessária uma análise mais detalhada, como o isolamento e a análise por RMN. De acordo com o padrão de fragmentação que apresentou o íon em m/z 387, a partir do íon base, sendo esta a fragmentação de maior intensidade e explicada a partir de uma reação de Rearranjo Remoto de Hidrogênio com migração de carga para a Urundevina B (Fig. 7) e por uma reação de Retro Diels-Alder para as Urundevinas D (Fig. 8) e F (Fig. 9), todas as três estruturas apresentam perdas de -136.

FIGURA 7—PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO DO ÍON EM M/Z 523 – URUNDEUVINA B

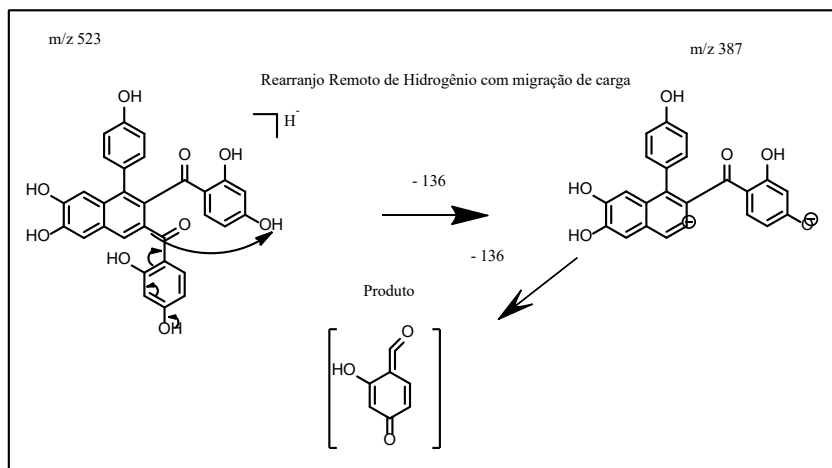


FIGURA 8—PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO DO ÍON EM M/Z 523 – URUNDEUVINA D

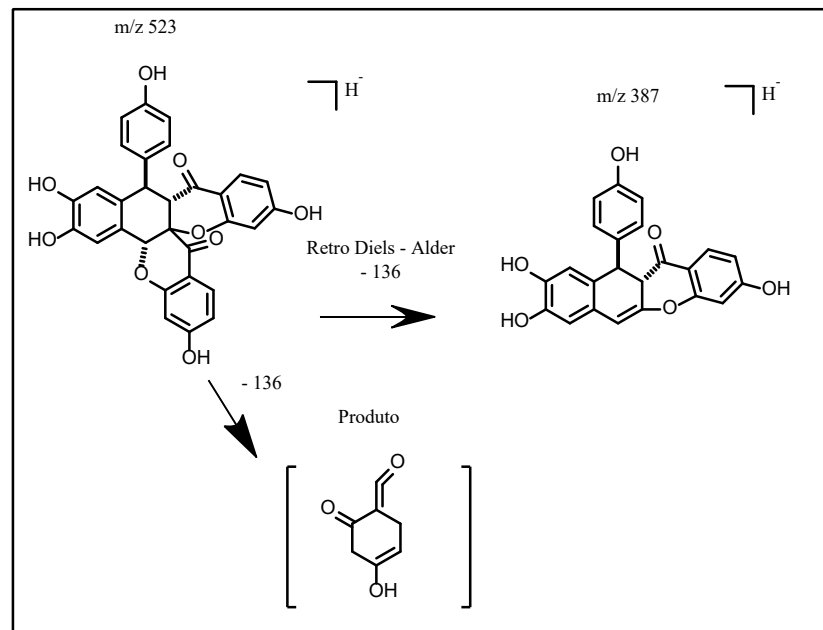
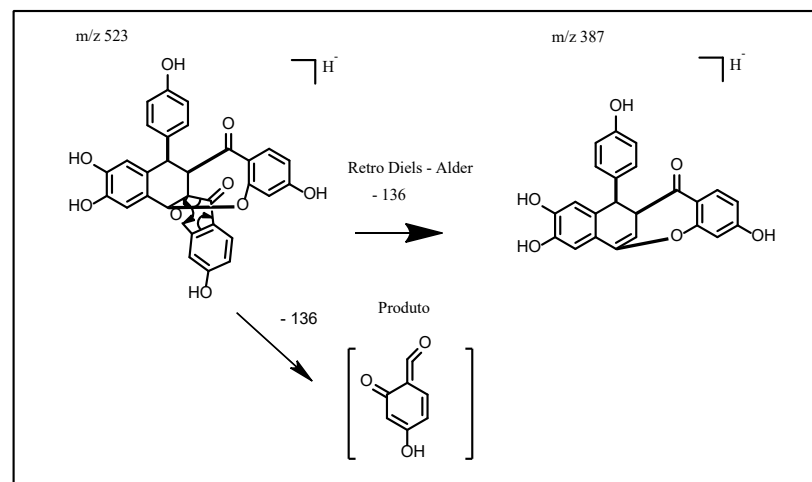


FIGURA 9—PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO DO ÍON EM M/Z 523 – URUNDEUVINA F



Os Compostos 23 (Tr 50,7 min), 30 (Tr 54,1 min), 39 (Tr 60,0 min) e 42 (Tr 68,9 min) foram considerados isômeros do Composto 20, pois apresentam mesma massa com íon desprotonado em 523 $[M-H]^-$ e mesma fragmentação.

O Composto 21 no Tr 50,0 min apresentou espectro de massas com pico do íon molecular desprotonado em m/z 539 $[M-H]^-$. De acordo com a literatura, sugerimos putativamente que esta massa corresponde à estrutura da Urundeuquina E ou H. Não foi possível afirmar a qual das duas substâncias sugeridas pertence a massa encontrada neste trabalho, visto que ambas são encontradas na literatura e apresentam a mesma massa de 539 e mesma fragmentação, sendo necessária uma análise mais detalhada.

A proposta de fragmentação para Urundeuquina E e H está representada nas Fig. 10 e 11, respectivamente. O padrão de fragmentação apresentou o íon em m/z 403 a partir do íon base, sendo esta a fragmentação de maior intensidade e explicada a partir de uma reação de Rearranjo Remoto de Hidrogênio com migração de

carga para a Urundeuvina E e H, com perda de -136. Estes dados para a estrutura sugerida corroboram os dados da literatura¹⁷. Os Compostos 24 (Tr 51,5 min), 29 (Tr 53,7 min) e 41 (Tr 64,9 min) foram considerados isômeros do Composto 21, pois apresentam mesma massa e mesmo padrão de fragmentação.

FIGURA 10—PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO DO ÍON EM M/Z 539 – URUNDEUVINA E

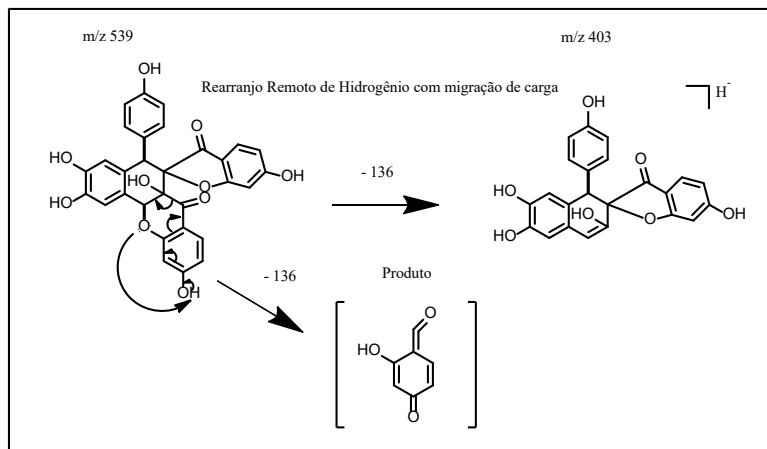
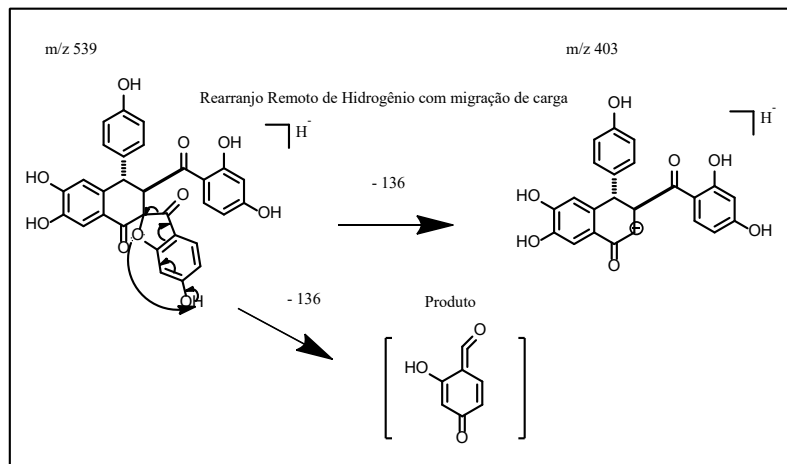
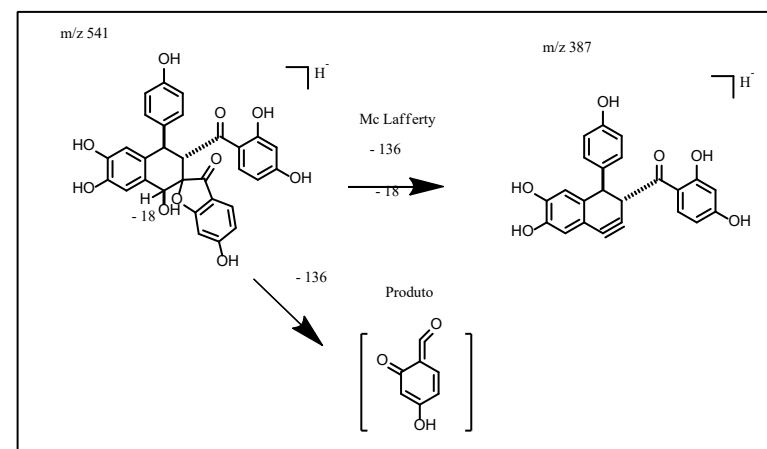


FIGURA 11—PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO DO ÍON EM M/Z 539 – URUNDEUVINA H



O Composto 25 no Tr 52,1 min apresentou espectro de massas com pico do íon molecular desprotonado em m/z 541 $[M-H]^-$. Com base na literatura,¹⁷ esta massa corresponde à estrutura da Urundeuvina G, uma chalcona¹⁷. A sugestão foi realizada de acordo com a fragmentação formada a partir do íon base, apresentando como principal fragmentação e de maior intensidade o íon fragmento em m/z 387 explicada a partir de uma reação de Mc Lafferty com uma perda de -136 e -18 Daltons (Fig. 12). Os Compostos 27 (Tr 53,1 min), 32 (Tr 55,1 min), 34 (Tr 56,6 min) e 36 (Tr 58,1 min) foram considerados isômeros do Composto 25 por apresentar mesma íon em m/z 541 e mesmo padrão de fragmentação.

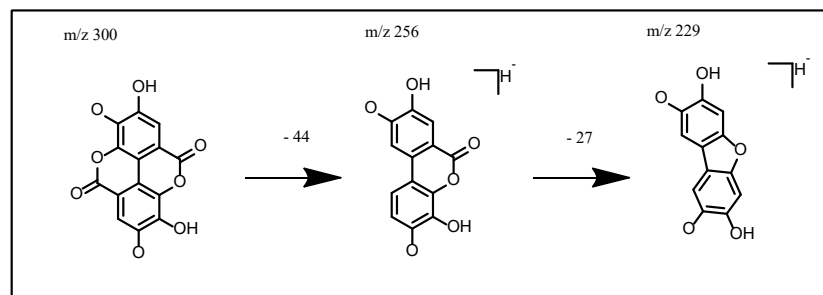
FIGURA 12—PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO DO ÍON EM M/Z 541—URUNDEUVINA G



O Composto 26 no Tr 52,4 min apresentou espectro de massas com pico do íon molecular desprotonado em m/z 300 $[M-H]^-$. Sugerimos putativamente que a estrutura é consistente com o ácido elágico, de acordo com o padrão de fragmentação que apresentou o íon em m/z 256 a partir do pico íon base, com perda de -44 correspondente a um CO_2 e uma outra fragmentação gerando o íon

em m/z 229 originado da perda de -27 correspondente a um CO (Fig. 13). Tal sugestão vai de encontro com a literatura¹⁸.

FIGURA 13—PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO DO ÍON EM M/Z 300



O Composto 28 no Tr 53,3 min apresentou espectro de massas com pico do íon molecular desprotonado em m/z 525 [M-H]⁻. Com base em pesquisas realizadas na literatura, sugerimos esta massa como sendo da estrutura da Matosina ou da Urundeuvina J, ambas classificadas como chalconas. Não foi possível sugerir com clareza qual seria das duas substâncias, pois ambas possuem o mesmo íon em m/z 525 e padrões de fragmentação também bastante semelhantes.

A sugestão foi realizada com base na fragmentação obtida a partir do pico íon base, apresentando íon em m/z 389, sendo essa a principal fragmentação e o íon de maior intensidade, gerando uma perda de -136 explicada por uma reação de Retro Diels-Alder (RDA). A proposta de fragmentação, tanto para a Matosina como para a Urundeuvina J, está representada nas Fig. 14 e 15 respectivamente. Os Compostos 31 (Tr 54,5 min), 33 (Tr 55,7 min), 35 (Tr 57,2 min), 37 (Tr 58,4 min), 38 (Tr 59,9 min) e 40 (Tr 60,7 min) foram considerados isômeros do Composto 28 por apresentar mesmo íon em m/z 525 e mesmo padrão de fragmentação. Estes dados vão de encontro com os dados da literatura¹⁷.

FIGURA 14—PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO DO ÍON EM M/Z 525 – MATOSINA

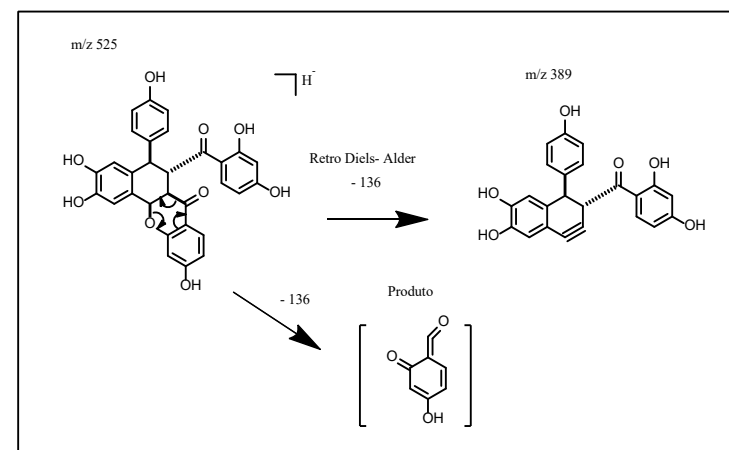
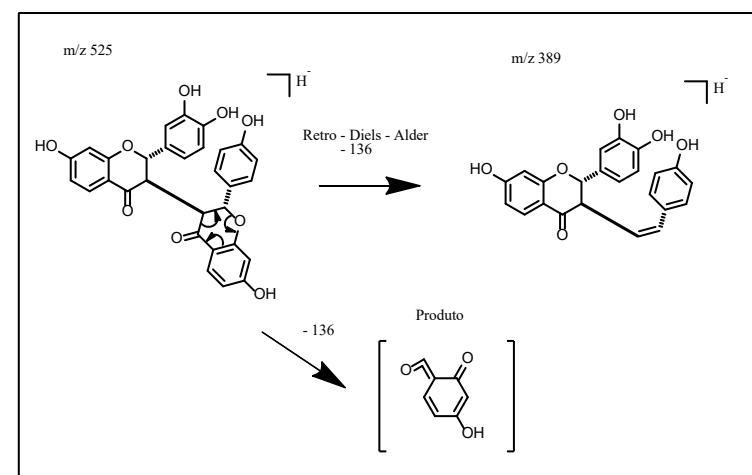


FIGURA 15—PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO DO ÍON EM M/Z 525—URUNDEUVINA J



DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE *IN VITRO*: MÉTODO DE SEQUESTRO DO RADICAL LIVRE 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZILA (DPPH)

O resultado da atividade antioxidante do EEB foi obtido por meio da curva de calibração e expresso por meio da média C150

± EPM (Erro Padrão da Média), utilizando como padrão o ácido ascórbico (AA).

Obtivemos um valor da CI_{50} do EEB de $18,76 \pm 2,18 \mu\text{g/mL}$, apresentando um valor próximo ao obtido pela substância padrão (AA), que apresentou CI_{50} de $16,34 \pm 1,94 \mu\text{g/ml}$. Além disso, observamos que, mesmo em baixas concentrações de EEB, obtivemos uma porcentagem de atividade antioxidante acima de 30% para a menor concentração ($15 \mu\text{g/ml}$); e para a maior concentração de $27 \mu\text{g/ml}$, observamos uma porcentagem de atividade antioxidante em torno de 70%, ressaltando assim o potencial antioxidante do EEB de *M. urundeuva*.

A porcentagem de atividade antioxidante corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, logo a CI_{50} representa a quantidade de compostos antioxidantes capazes de reduzir em 50% o DPPH, ou seja, quanto menor o valor da CI_{50} maior será sua capacidade de consumo de DPPH e sendo assim maior sua atividade antioxidante²³.

Ao avaliar a atividade antioxidante pelo método DPPH do extrato etanólico das cascas de *M. urundeuva*, os autores obtiveram um valor de CI_{50} $789 \mu\text{g/mL}$ ²⁴. Na avaliação da atividade antioxidante do extrato etanólico das cascas de aroeira preta, os autores obtiveram uma CI_{50} de $116,50 \mu\text{g/mL}$ ²⁵. Dessa forma, os resultados observados no presente trabalho apresentam valores de CI_{50} menores que os dados já relatados na literatura, indicando assim um potencial antioxidante. Alguns estudos atribuem a atividade antioxidante à presença de composto fenólicos, que vêm despertando interesse por propriedades redutoras e inibitórias, desempenhando uma função importante no sequestro de radicais livres, bem como neutralizando-os²³.

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS

Para a quantificação do teor de fenóis totais do EEB de *M. urundeuva*, construiu-se uma curva de calibração com o padrão ácido gálico nas concentrações de 7,5; 15; 105; 135 e 150 $\mu\text{g/ml}$, e realizou-se a interpolação dos valores de absorvância obtidos das amostras testadas. Através da equação de regressão linear do padrão ácido gálico, obtivemos a equação da curva de calibração $y = 0,006x - 0,029$ e o coeficiente de correlação (R^2), que foi de 0,998.

Com o auxílio da equação da reta, calculamos o teor de fenólicos totais em mg EAG/g de extrato e obtivemos uma alta concentração de compostos fenólicos de $387,49 \pm 15,09 \text{ mg EAG/g}$ de EEB, valor este muito maior que os encontrados na literatura para a mesma espécie, a saber: no estudo das cascas de *M. urundeuva* coletadas na região da caatinga, o teor de fenóis foi de $46,44 \pm 07,05$ por mg de extrato²⁶. Ao analisar o teor de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu das folhas e cascas do caule de *M. urundeuva*, os autores obtiveram um teor de fenóis de 194 mg EAG/g do extrato metanólico das folhas e de 193 mg EAG/g dos extratos metanólicos das cascas do caule²⁷. Em outro estudo da aroeira com extratos de acetona-água e metanol-água, os autores obtiveram valores de teor de fenóis de $43,8 \text{ mg EAG/g}$ e $37,7 \text{ mg EAG/g}$, respectivamente. Os autores observaram ainda por CLAE uma grande quantidade de taninos, como ácidos gálicos e elágicos, além de flavanonas e flavanóis, porém em concentrações menores¹².

Sendo assim, com base na literatura e nos resultados obtidos neste trabalho, é notório o alto teor de compostos fenólicos encontrados para a espécie de *M. urundeuva*, demonstrando o seu potencial antioxidante.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, o estudo fitoquímico do extrato metanólico das cascas de *Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão permitiu sugerir putativamente por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas a identificação de 42 substâncias, bem como propor suas estruturas e fragmentações, sendo estas já relatadas para a espécie em estudo. Mesmo encontrando substâncias já relatadas na literatura, o estudo contribuiu agregando informações referentes à composição química de uma espécie pertencente ao Cariri Paraibano e que, por estarem inseridas na região da caatinga, ainda são poucas estudadas, além de evidenciar o potencial de compostos fenólicos presentes na espécie. O teor de compostos fenólicos, bem como a atividade antioxidante, apresentou bons resultados e até valores superiores de teor de fenóis ($387,49 \pm 15,09$ mg EAG/g de EEB) e potencial antioxidante ($CI50 = 18,76$ μ g/ml de EEB), quando comparados com dados na literatura para a mesma espécie.

É necessário ainda que estudos fitoquímicos sejam realizados a fim de descobrir e isolar possíveis novas substâncias, visto que esta espécie está inserida em uma região com características de clima, solo e radiação bem adversas. Isso pode favorecer a produção de novos metabólitos secundários, além da possibilidade de avaliar outros métodos de extração de outras partes da planta, as possíveis substâncias que venham a ser isoladas frente a atividades antioxidantes, teor de fenóis e, quem sabe, atividade antimicrobiana, uma vez que esta última é bastante relatada na literatura tanto por seu uso na medicina popular como em testes *in vitro*.

REFERÊNCIAS

1. PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*, v.25, n.1, p.45-61, 2002.
2. DUARTE, D. F.; Uma Breve História do Ópio e dos Opióides. *Opium and Opioids: A Brief History*. *Rev. Bras. Anestesiol.*, v. 55, n. 1, p. 135-146, 2005.
3. VIEGA- JUNIOR., C.; BOLZANI, V. S. BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química nova*. v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
4. NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.*, v. 79, p. 629-661, 2016.
5. SCHISTEK, H. Caatinga, um bioma desconhecido e a “convivência com o semiárido”. In: DRUMOND, M. A.; SCHISTEK, H.; SEIFFARTH, J. A.; RUIZ, C. B.; ABROMOVAY, R.; OVERBECK, G. Caatinga: um bioma exclusivamente brasileiro e o mais frágil. *Revista do Instituto Humanitas Unisinos*. São Leopoldo, n. 389, ano XII, abr. 2012.
6. HAUFF, S. N. 2010. Representatividade do Sistema Nacional de Unidades de Conservação na Caatinga. Ministério do Meio Ambiente. Brasília. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/203/_arquivos/representativconservcaat_shauff_revisojoo_03___produto_final_203.pdf>. Acesso em: 07 de outubro de 2016.

7. MARANGONI, C. Plantas medicinais tradicionalmente utilizadas no nordeste do Brasil: potencial antimicrobiano para tratar distúrbios das vias gênito-urinárias. 2015. 109f. Dissertação (Mestrado em Biologia vegetal) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.
8. CARVALHO, P. E. R.; Aroeira- verdadeira. Embrapa Florestas – Circular técnica 82. 16p. Colombo – PR. Dezembro, 2003.
9. VIANA, G. S. B.; BANDEIRA, M. A. M.; MOURA, L. C.; SOUZA-FILHO, M. V. P.; MATOS, F. J. A.; RIBEIRO, R. A. Analgesic and Antiinflammatory Effects of the Tannin Fraction from *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. *Phytotherapy research*. v. 11, p. 118-122, 1997.
10. VIANA, G. S. B.; BANDEIRA, M. A. M.; MATOS, F. J. A. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemão. *Phytomedicine*. v. 10, p. 189-195, 2003.
11. AQUINO, N. C. Aplicação de técnicas espectrométricas e cromatográficas na caracterização de seis tipos químicos de *Myracrodruon urundeuva* fr. allem (aroeira-do-sertão). 2013. 113f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.
12. QUEIROZ, C. R. A. A.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*), Sociedade de Investigações Florestais. *Revista Árvore*. v. 26, n. 4, p. 485-492, 2002.
13. FERNANDES, A. F. C.; **Avaliação da Atividade Antimicrobiana do Extrato Etanólico e Fases Particionadas de *Myracrodruon urundeuva* Fr Allemão (Aroeira-do-sertão)**. 2011. 51f. Monografia (Graduação em Farmácia). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2011.
14. DUARTE, S. L. F.; Constituintes químicos de *Phyllanthus acuminatus* Vahl (PHYLLANTHACEAE): isolamento, caracterização estrutural e atividades biológicas. 2013. 116f. Dissertação (Mestrado em Farmacoquímica). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.
15. GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; HAMERSKI, L.; MIGUITA, C. H. Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapota mica*. **Quim. Nova.**, v. 32, N. 2, p. 407-411, 2009.
16. GULCIN, I.; SAT, I. G.; BEYDEMIR, S.; ELMASTAS, M.; KUFREVIOGLU, O. I. Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). **Food Chemistry**, v.87, n.3, p. 393-400, 2004.
17. AQUINO, N. C. **Aspectos químicos, do estudo químico farmacológico agrônomo de aroeiras-do-sertão (*myracrodruon urundeuva* fr. all), silvestres e cultivadas**. 2017. 432f. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

18. SINGH, A.; BAJPAI, V.; KUMAR, S.; SHARMA, K. R.; KUMAR, B. Profiling of Gallic and Ellagic Acid Derivatives in Different Plant Parts Of *Terminalia arjuna* by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS. *Natural Product Communications*. v. 11, n. 2, p. 239-244, 2016.
19. SILVA, V. C.; NAPOLITANO, A.; ELETTO, D.; RODRIGUES, C. M.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. Characterization of gallotannins from *Astronium* species by flow injection analysis-electrospray ionization-ion trap tandem mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *European Journal of Mass Spectrometry*. v. 17, p. 365-375, 2011.
20. SOBEH, M. et al. High resolution UPLC-MS/MS profiling of polyphenolics in the methanol extract of *Syzygium samarangense* leaves and its hepatoprotective activity in rats with CCl₄-induced hepatic damage. *Food and Chemical Toxicology*. v. 113, p. 145-153, 2018.
21. SIMIRGIOTS, M. J.; BENITES, J.; ARECHE, C.; SEPÚLVEDA, B. Antioxidant Capacities and Analysis of Phenolic Compounds in Three Endemic *Nolana* Species by HPLC-PDA-ESI-MS. *Molecules*. v. 20, p. 11490-11507, 2015.
22. NCUBE, E. N. et al., Analyses of chlorogenic acids and related cinnamic acid derivatives from *Nicotiana tabacum* tissues with the aid of UPLC-QTOF-MS/MS based on the in-source collision-induced dissociation method. *Chemistry Central Journal*. v. 8, n. 66, 2014.
23. SOUSA, C. M. M.; et al., Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*. 30, 351-355. 2007.
24. FRANÇA, E. L. T.; QUEIROZ, T. M.; ARAÚJO, A. R. S.; MACÊDO, A. A. M. Atividade antioxidante pelo método DPPH de extrato vegetal da casca da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). In: CONGRESSO NORTE NORDESTE DE PESQUISA E INOVAÇÃO, VII., 2012, Palmas. *Anais*. Palmas, 2012.
25. OLIVEIRA, C. S. C.; PEREIRA, E. P. L.; RIBEIRO, P. R.; LOUREIRO, M. B.; DE CASTRO, R. D.; FERNANDEZ, L. G. Fenóis totais e atividade antioxidante de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. Allemao e *Schinus terebinthifolius* Raddi. In: 50º Congresso Brasileiro de Química., 2010, Cuiabá. *Anais*. Cuiabá, 2010.
26. MONTEIRO, J. M.; LINS NETO, E. M. F.; AMORIM, E. L. C.; STRATTMANN, R. R.; ARAUJO, E. L.; ALBUQUERQUE, U. P. Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpátricas da Caatinga. *Revista árvore*, v. 29, p. 999-1005, 2005b.
27. VIEIRA, L. M. et al., Fenóis totais, atividade antioxidante e inibição da enzima tirosinase de extratos de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Anacardiaceae). *Rev. Bras. Pl. Med.* v. 17, n. 4, p. 521-527. 2015.

AVALIAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO NA OBTENÇÃO DO DESTILADO DE MANGABA (*HANCORNIA SPECIOSA*)

Éder do Nascimento Sousa

Universidade Federal de Campina Grande–Sumé – PB
eder_gh@hotmail.com

Bernadete de Farias Ramos

Universidade Federal de Campina Grande–Sumé – PB
bernadetefarias_@hotmail.com

Bruno Rafael Pereira Nunes

Universidade Federal de Campina Grande–Sumé – PB
bruno.nunes@ufcg.edu.br

INTRODUÇÃO

O cerrado e a caatinga são dois dos biomas mais importantes que compõem o território brasileiro, representando cerca de 35% de toda a sua extensão. O potencial de extração desses biomas é sem precedentes, sendo flores, folhas, sementes e frutos apenas algumas das inúmeras fontes de matéria-prima que podem servir à população¹.

Presente tanto na caatinga como no cerrado, encontra-se a mangabeira (*Hancornia speciosa*) – planta nativa brasileira que ocorre nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Norte e Nordeste². A mangabeira apresenta um porte não muito alto, copa de forma inconstante, tronco bem envergado, rugoso e com muitas ramificações, ramos lisos e de cor vermelha. Seus frutos são do tipo baga, sendo seus formatos e tamanhos variáveis, circulares ou

elipsoidais, de cores amarelo ou verde, contendo uma polpa amarela, bem doce, que, por sua vez, é bastante rica em vitaminas³.

O fruto, conhecido como mangaba, é constituído de 77% de polpa, 12% de semente e 11% de casca. Com um sabor característico e altamente apreciado pela população, contém elevado conteúdo de sólidos solúveis, ligado a alta acidez. Os números pertencentes à quantidade de açúcar em relação aos sólidos solúveis totais são próximos de 77%, e 59% de açúcares redutores em relação aos totais⁴.

No ano de 2015, a produção de mangaba atingiu o número de 663 toneladas. Do seu total na produção nacional, os estados da Paraíba e Sergipe representam 53%⁴. Com a ocorrência de certa variação de ano após outro, dependendo da época, a frutificação da planta se dá de forma irregular. Ainda assim, a coleta dos frutos se dá em uma época definida, geralmente entre os meses de outubro e abril¹. Para se ter uma boa qualidade na colheita dos frutos, avaliam-se as condições de desenvolvimento que tem importância na fase pós-colheita. Se colhidos antes de atingirem total maturação, prejudicam seu processo de amadurecimento, comprometendo a qualidade do produto final. A colheita de frutos completamente maduros diminui sua vida útil, causando problemas de transporte e manuseio, por consequência da baixa resistência física, havendo perdas de grande quantidade de frutos⁵.

Devido a sua composição e disponibilidade, o fruto da mangabeira apresenta-se como uma alternativa no desenvolvimento de bioprodutos de alto valor agregado, com boas características sensoriais e maior tempo de vida de prateleira, podendo ser utilizado como matéria-prima em processos de conversão, como os processos de fermentação e destilação.

Os processos fermentativos vêm sendo utilizados desde a Antiguidade, mesmo não havendo o conhecimento necessário em relação ao entendimento de como se davam as reações. Com o

tempo e o crescimento cada vez maior dos estudos sobre o tema, foi esclarecido e denominado o termo fermentação, processo no qual acontece a reprodução de um microrganismo, originária de uma fonte rica em nutrientes, com o intuito de adquirir um bioproduto. Vários ramos da indústria se beneficiam da fermentação, causando um impacto significativo na sociedade. Como exemplos, podem ser citadas as indústrias químicas e farmacêuticas. Na área alimentícia, destacam-se a produção de queijos, iogurtes e bebidas. Mesmo com uma enorme variedade de produtos sendo originados por esses processos, um dos mais utilizados é a fermentação alcoólica⁶.

A fermentação alcoólica é a conversão de um substrato, o açúcar, através de uma levedura em um metabólito, o álcool etílico. Comumente é utilizada a levedura *Sacharomyces cerevisiae*, a qual realiza o processo de fermentação de açúcares com o intuito de conseguir energia química suficiente para sobreviver, fazendo com que o etanol seja um produto gerado nesse processo. Para se alcançar um bom desempenho, é necessário que a levedura, o principal fator constituinte de uma fermentação alcoólica, apresente certas qualidades que a validem como apta para o processo, entre eles, um bom rendimento, certa resistência e estabilidade, assim como ter tolerância ao álcool⁷.

Para uma melhor compreensão da fermentação, recomenda-se que seja realizada uma avaliação da cinética do processo. A análise cinética basicamente tem início no estudo da evolução dos valores de concentração de um ou vários componentes do sistema de cultivo, em razão do tempo de fermentação. São definidos como componentes o microrganismo (ou biomassa), os produtos do metabolismo e os nutrientes ou substratos que fazem parte do meio de cultura⁸.

Em uma dada fermentação, acontecem muitas transformações simultâneas, nas quais as células crescem, se desenvolvem

e morrem, substâncias das mais variadas são consumidas pelos microrganismos e produtos resultantes do metabolismo são lançados no meio. Tratando-se da fermentação alcoólica, os mais importantes fatores a serem estudados são as alternâncias das concentrações de células, de substrato e de concentração de etanol com o tempo. Algumas outras substâncias, como o gás carbônico (CO₂) ou outros nutrientes, também podem ser estudados⁹.

O estudo cinético dos processos fermentativos requer o entendimento e o uso de parâmetros que facilitem a análise da produção de células e produção da substância desejada, como o etanol. Fazem parte desses parâmetros o rendimento do produto (Y_{P/S}) e o fator de conversão de substrato em biomassa (Y_{X/S}), determinados por meio das Equações (1) e (2):

$$Y_{P/S} = \frac{P_t - P_0}{S_0 - S_t} \quad \text{Equação (1)}$$

$$Y_{X/S} = \frac{X_t - X_0}{S_0 - S_t} \quad \text{Equação (2)}$$

Em que P₀ e P_t são as concentrações (gL⁻¹) inicial e final do etanol; X_t e X₀ as concentrações (gL⁻¹) inicial e final de células, e S₀ e S_t as concentrações (gL⁻¹) inicial e final de sacarose, respectivamente¹⁰.

Um fruto que contenha certos níveis de umidade, açúcar e nutrientes que satisfaçam as leveduras é desejável como elemento essencial para fabricação de bebidas fermentadas, que posteriormente possam ser destiladas¹¹. A indústria de alimentos está à procura de novidades na área de bebidas e sabores, buscando

sempre um melhor produto e sua expansão diante da população. Assim, a otimização de produtos é de suma importância para a manutenção e o aumento do setor do mercado de bebidas¹². O uso de frutas como o principal elemento para a produção de bebidas alcoólicas é uma alternativa a reduzir as perdas consideráveis de frutos na lavoura. Também surge como uma alternativa ao consumidor, que está em busca de produtos e sabores diversificados¹³.

A destilação é o fenômeno referente à separação de componentes de uma mistura devido a uma diferença de pressão de vapor. Toda substância com determinado ponto de ebulição é volátil e possui um determinado valor de pressão de vapor, que, por sua vez, é dependente da temperatura¹⁴. Um processo de destilação separa os componentes com base em sua volatilidade. Os compostos mais voláteis, como metanol e o acetaldeído, são destilados primeiramente na fração “cabeça”; já os menos voláteis, como os álcoois superiores, são destilados posteriormente nas frações “coração” e “cauda”. A parte de interesse fica por conta do coração, correspondente a cerca de 85% do volume total do destilado¹⁵.

Com isso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento cinético no desenvolvimento de uma bebida fermentada a partir da polpa da mangaba, conduzindo o processo em batelada sem agitação, determinando os valores dos parâmetros cinéticos; e, em seguida, realizar a produção do destilado.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no laboratório de Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da UFCG, entre os meses de junho e julho de 2018.

MATÉRIA-PRIMA

Foram utilizados cerca de 8,0kg de polpa de mangaba, obtidos em estabelecimento comercial situado no município de Campina Grande-PB, tendo em vista a dificuldade em obter o fruto *in natura* durante o período de desenvolvimento da pesquisa. O material ficou armazenado em congelador até o início do trabalho.

MICROORGANISMO

O microrganismo utilizado foi a levedura *Sacharomyces cerevisiae* – fermento biológico comercial em pó, sendo este o responsável por metabolizar os açúcares anaerobicamente.

PREPARO DO MOSTO E CORREÇÕES

A polpa da fruta foi processada em um liquidificador doméstico (da marca Arno), com o uso de 500 mL de água mineral para cada quilo de polpa, adquirindo-se o mosto. A aplicação do mosto se deu em duas etapas. Inicialmente, foram utilizados 4 kg de polpa, para obtenção dos dados cinéticos da fermentação. Posteriormente, procedeu-se da mesma forma com os 4 kg restantes. Na segunda fermentação, não foi realizado o acompanhamento dos parâmetros, apenas foram reproduzidos todos os métodos utilizados na primeira fermentação.

Com o mosto obtido, foi realizada a filtração com o auxílio de um filtro de tecido para impedir que partículas maiores estivessem presentes no meio reacional. Após devidamente filtrado, transferiu-se para dois béqueres de 5000 mL. Em seguida, os recipientes, contendo o mosto, foram aquecidos até o início da ebulição da solução.

FIGURA 1—PROCESSO DE AQUECIMENTO DO MOSTO



Em seguida, foi realizada a chaptalização, um processo no qual, para atingir o grau alcoólico desejado, se faz necessária a adição de açúcar ao mosto para permitir a correção deste componente¹⁶. Foi realizada a análise dos sólidos solúveis totais de cada um dos béqueres contendo o mosto, através do refratômetro ABBE de bancada modelo Q767B da marca Quimis, sendo verificados teores iniciais de 5 e 6 °Brix, para a primeira e a segunda fermentação, respectivamente. Após isso, foi realizada a chaptalização, havendo o acréscimo de açúcar cristal no mosto, alcançando-se um teor de sólidos solúveis totais de 17° Brix.

A próxima etapa da preparação do mosto foi a correção do pH. Por meio da utilização do pHmetro digital PH 2600 da marca Instrutherm, foi realizada a visualização do pH do mosto de mangaba já após a chaptalização. Em seguida, para redução da acidez, foi utilizada uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,2 M.

O volume total, após as correções, foi autoclavado a 121°C e 1 atm, por 15 minutos, em Erlenmeyers. Em seguida, foi realizada

uma nova filtração, de modo a deixar o mosto em condições ideais de fermentação. Por fim, realizou-se novamente a esterilização em autoclave, em condições similares à realizada anteriormente; e após resfriamento, foi possível dar início à fermentação.

FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Para a condução desse processo, foi utilizado como reator uma garrafa PET, com capacidade de 10 L. Na parte inferior, foi instalada uma torneira para coleta de amostras do mosto, como apresentado na Fig. 2:

FIGURA 2—REATOR UTILIZADO NO PROCESSO FERMENTATIVO SEM AGITAÇÃO



Fonte: RAMOS (2018)¹⁷

O inóculo foi preparado em uma câmara de fluxo laminar, adicionando um volume de 5 L do mosto e 27 g da levedura (5,4 g de levedura por L de mosto). O mosto permaneceu no reator por 7 dias, em temperatura ambiente. Durante este período, foram determinadas as concentrações de células e de sólidos totais em

°Brix, além do pH do meio reacional. Inicialmente, alíquotas de 10 mL foram coletadas a cada 2 horas, nas primeiras 24 horas. Nos demais dias, foram coletadas apenas uma amostra, a cada 24 horas.

PARÂMETROS CINÉTICOS DO PROCESSO FERMENTATIVO

Para a obtenção dos parâmetros cinéticos do processo fermentativo, foram utilizados os resultados obtidos por meio da coleta das alíquotas de 10mL, em intervalos de tempo definidos.

CRESCIMENTO CELULAR

A concentração de células foi determinada a partir da filtração a vácuo das amostras em papel em filtro, sendo os papéis previamente submetidos a secagem em estufa a 50°C por 24 horas para determinação da sua massa (M_1). O papel filtro contendo as células retiradas também passou por um processo de secagem em estufa a 55°C por 24 horas. Após a secagem, com o auxílio de uma balança analítica, foi possível determinar a massa do conjunto (papel + células) (M_2). Os cálculos para obter a massa celular (x), em gramas por litro, para cada amostra filtrada foram realizados através da Equação (3)¹⁸.

$$X(gL^{-1}) = (M_2 - M_1) \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

CONSUMO DO SUBSTRATO

Para determinação do teor de sólidos solúveis totais (TSS) expressos em °Brix, foi utilizado o refratômetro de bancada (Abbe

EEQ90006B), previamente calibrado. A partir do resultado obtido, foi calculada a concentração de sacarose do mosto expressa em gramas de sacarose por litro de mosto, com base na Equação (4)¹⁰:

$$\text{sacarose (g L}^{-1}\text{)} \equiv 10,13 \times TSS + 1,445 \quad \text{Equação (4)}$$

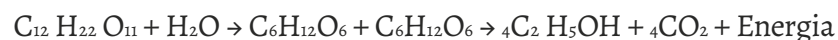
PRODUÇÃO DE ETANOL

A determinação do teor de etanol do fermentado foi realizada utilizando-se dados coletados com o refratômetro, que mede o °Brix. A partir desta medida, foi estimada a concentração de álcool etílico por meio da conversão do valor em °Brix, apresentado pelo refratômetro, para %ABV (mL de álcool por 100 mL de solução), utilizando-se a ferramenta disponível em: <http://onebeer.net/refractometer.shtml>.

O cálculo se baseia nas relações entre a quantidade de sólidos solúveis, presentes no início e ao término do processo, e a densidade do meio. Para um menor teor de sólidos solúveis, a solução apresenta uma menor densidade, o que indica um maior teor de etanol.

DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO E DA PRODUTIVIDADE

A fermentação alcoólica pode ser representada pela equação química:



A partir da estequiometria da reação e conhecendo-se a densidade do etanol, é possível determinar a concentração de etanol

máxima teórica (Q_t). Com os dados coletados durante o processo, pode-se determinar a concentração de etanol experimental (Q_e). Os resultados, expressos em (g L^{-1}), foram encontrados por meio da utilização das Equações (5) e (6):

$$Q_t = \frac{\text{g de sacarose}}{\text{L de mosto}} \times 0,682 \frac{\text{mL de etanol}}{\text{g de sacarose}} \times 0,789 \frac{\text{g de etanol}}{\text{mL de etanol}} \quad \text{Equação (5)}$$

$$Q_e = \frac{\text{mL de etanol}}{100 \text{ mL de mosto}} \times 0,789 \frac{\text{g de etanol}}{\text{mL de etanol}} \times \frac{1000 \text{ mL de mosto}}{1 \text{ L de mosto}} \quad \text{Equação (6)}$$

Para determinar o rendimento (R) e a produtividade (P), foram utilizadas as Equações (8) e (9), respectivamente. O rendimento expresso em (%) e a produtividade em ($\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$):

$$R = \frac{Q_e}{Q_t} \times 100 \quad \text{Equação (7)}$$

$$P = \frac{Q_e}{t} \quad \text{Equação (8)}$$

Em que Q_e = concentração de etanol experimental (g L^{-1}), Q_t = máxima concentração de etanol teórica (estequiométrica) (g L^{-1}), e t = tempo de fermentação (h).

CENTRIFUGAÇÃO

Ao término do processo fermentativo, foi realizada a centrifugação do fermentado, com o uso da centrífuga da marca Lo-

gen Scientific. Processo foi realizado com objetivo de se atingir um produto livre ao máximo de impurezas, promovendo a sedimentação das partículas mais espessas. Logo após a separação, o fermentado foi armazenado em garrafas PET de 1,5 L, que foram acondicionadas em geladeira.

DESTILAÇÃO

A destilação foi realizada com o auxílio de um destilador artesanal, formado por um sistema de aquecimento, composto por uma chapa da marca Logen, a caldeira do destilador, sendo uma panela de pressão com capacidade para 4,5L, e o sistema de resfriamento, composto por um balde e uma mangueira conectada a uma torneira e a uma serpentina de condensação feita com tubo de cobre. Um béquer foi utilizado para a coleta do destilado e um densímetro alcoômetro (Alcoolômetro Gay-Lussac-Incoterm) para determinação do teor alcoólico.

Inicialmente, um volume de 3L de fermentado passou por uma primeira destilação, obtendo-se um volume de 1,1L de destilado. Em seguida, realizou-se uma segunda destilação do volume de 1,1L, em que se procedeu à separação das frações cabeça, coração e cauda do destilado. Foram coletados os 10% iniciais, referentes à cabeça. A fração coração foi obtida de acordo com o teor alcoólico desejado, sendo este correspondente a 41%. O volume restante, correspondente à fração cauda, foi descartado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os processos fermentativos utilizando polpa de mangaba como substrato foram realizados em um reator em batelada, sem agitação. O mosto fermentado obtido durante a primeira batela-

da apresentou uma boa recuperação do produto, apresentando uma tonalidade mais escura. Na segunda fermentação, realizada para adquirir um volume adicional de fermentado, visando a posterior obtenção do destilado, apresentou cor mais clara e elevada turbidez, com significativa perda volumétrica, na etapa de centrifugação.

Essa redução no volume do fermentado obtido, bem como a maior turbidez, pode ter relação com uma possível entrada de oxigênio no reator, que pode ter interferido na geração do etanol pela levedura. A fermentação alcoólica é impedida na presença de elevadas concentrações de oxigênio, processo conhecido como “Efeito Pauster”. Este fenômeno está relacionado ao estado fisiológico da célula, sendo que ocorre na maioria dos casos nas leveduras que não estão na fase de crescimento, nas quais acontece diminuição considerada do consumo específico de glicose¹⁹.

FIGURA 3— FERMENTADO OBTIDO AO FIM DOS PROCESSOS FERMENTATIVOS. AO CENTRO E À DIREITA, CORRESPONDE A PRIMEIRA FERMENTAÇÃO; À ESQUERDA, A SEGUNDA.

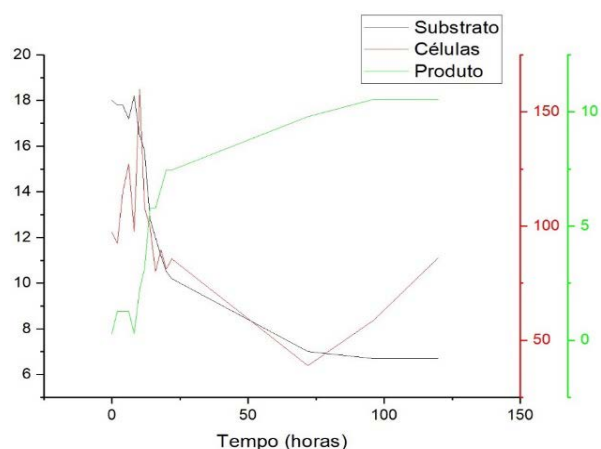


CINÉTICA DO PROCESSO FERMENTATIVO

O estudo cinético de um processo de biotransformação é fundamental, porque permite a aquisição de conhecimento básico do processo. A cinética de biotransformação está associada com a velocidade de consumo de substrato e de surgimento de produto, mais especificamente se tratando de processos fermentativos utilizando leveduras, também com a velocidade de crescimento celular e o efeito que estas sofrem por interferência das condições do meio em processo²⁰.

Na Fig. 4, é possível observar o comportamento cinético do crescimento celular (gL^{-1}), consumo de substrato ($^{\circ}\text{Brix}$) e produção de etanol ($\% \text{ABV}$) em função do tempo da fermentação, para o processo que foi conduzido em batelada e sem agitação.

FIGURA 4—PERFIL CINÉTICO DA PRODUÇÃO DO FERMENTADO EM FUNÇÃO DO TEMPO NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA REALIZADO NO REATOR SEM AGITAÇÃO

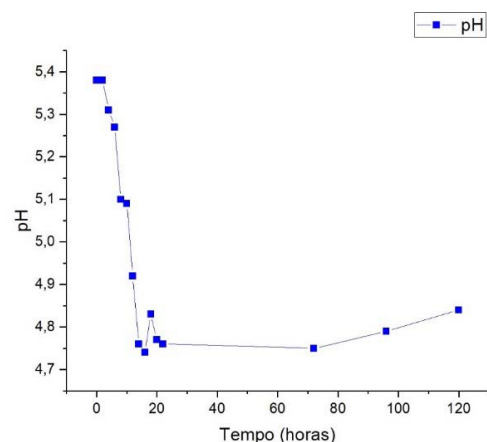


Nas primeiras horas da fermentação, houve um reduzido crescimento celular, sendo este irregular. Com isso, é possível considerar que, até oitava hora de fermentação, houve a adaptação do microrganismo ao meio, variando a concentração celular durante esse período de $97,38 \text{ gL}^{-1}$ a $97,73 \text{ gL}^{-1}$. Entre 8 e 14 horas, ocorreu um elevado incremento na concentração celular, sendo este período caracterizado como a fase exponencial de crescimento, com a concentração celular alcançando, nesse período, o máximo de $159,85 \text{ gL}^{-1}$. A glicose se metaboliza junto ao etanol, quando as células se mostram com uma enorme velocidade, com um tempo de geração entre 1 e 7 horas²¹.

Após esse período, houve uma redução acentuada da massa celular e isso pode ser atribuído à taxa de morte celular. Houve redução até o valor de $38,83 \text{ gL}^{-1}$. Nessa fase, há mais células mortas no meio do que células ativas. Essa fase se perpetua até que a população seja reduzida a uma pequena fração de células da fase anterior, ou até mesmo que desapareça completamente⁸. Entre 70 e 75 horas, a concentração celular sofreu um leve aumento. É possível que esse pequeno crescimento tenha ocorrido devido ao consumo de algumas frações de células, em fase de morte, por células vivas ainda presentes no mosto, sendo assim utilizadas para multiplicação²².

Durante a coleta de dados para a obtenção dos parâmetros cinéticos, também se verificou o pH do meio reacional. O pH considerado ideal em uma fermentação é próximo de 4,5²³. Já o pH ideal para a produção de etanol fica entre os valores de 4,5 e 5²⁴. Na Fig. 5, são apresentados os valores de pH, por tempo de fermentação.

FIGURA 5—PH DO MOSTO DE MANGABA DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO, REALIZADO EM BATELADA SEM AGITAÇÃO



Pela análise da Fig. 5, é observado um decréscimo considerável do valor do pH. A partir da vigésima hora de fermentação, o pH se mantém constante, porém não por todo o processo. Depois de 70 horas de fermentação, o pH aumentou um pouco e terminou o processo com valor final de 4,84, um pouco acima do valor ideal para estes processos, mas dentro da faixa recomendada para produção de etanol e de acordo com o encontrado na literatura. Em outro estudo semelhante, pesquisadores encontraram o pH final em mosto de mangaba no valor de 3,08²⁵. Em outro caso, foi observado pH final de 3,10 para o fermentado de umbu²⁶.

PARÂMETROS CINÉTICOS DO PROCESSO FERMENTATIVO

Nas Tabelas (1) e (2), são apresentados os resultados obtidos para a concentração de etanol experimental (Q_e), máxima concentração de etanol teórica (Q_t), rendimento, produtividade e fator de

conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$), no processo fermentativo estudado.

TABELA 1— CONCENTRAÇÃO TEÓRICA E EXPERIMENTAL DE ETANOL

Q_e (g/L)	Q_t (g/L)
83,16	98,89

TABELA 2— PARÂMETROS CINÉTICOS DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

Rendimento (%)	Produtividade (g/L·h)	$Y_{P/S}$
84,01	0,866	0,70

O rendimento do processo foi de 84,01%, o que, baseado em resultados obtidos por outros autores, pode ser considerado um bom rendimento, pois isso indica que mais de 80% da sacarose disponível foi transformada em álcool etílico. Já a produtividade alcançada foi de 0,866 g/L·h⁻¹, e esse valor indica que houve a necessidade de um tempo maior para atingir a quantidade de produto desejada, sendo inferior ao encontrado em estudos semelhantes.

Ao estudar a produção de fermentado de melão, foi alcançado rendimento de 90,54% e produtividade de 7,563 g/L·h⁻¹, sendo estes valores bem superiores aos obtidos no presente trabalho²⁷. Ao desenvolverem bebidas fermentadas de seriguela e cupuaçu, pesquisadores encontraram rendimentos um pouco menores que os apresentados na fermentação do mosto de mangaba, em estudo, sendo observados 54% para o cupuaçu e 68% para a seriguela. As produtividades foram semelhantes às encontradas nesta pesquisa, com valores de 0,59 g/L·h⁻¹ e 0,68 g/L·h⁻¹, respectivamente²⁸.

O rendimento em produto ($Y_{P/S}$) da fermentação utilizando polpa de mangaba foi de 0,70. Esse resultado pode ser compreen-

dido por uma série de fatores que influenciam o processo, como a inibição dos microrganismos devido ao alto teor de etanol no fim do processo, por exemplo. Outros fatores de extrema importância são a produção de níveis consideráveis de álcoois superiores, acetaldeídos e ésteres, como também crescimento significativo de leveduras, que absorvem grande maioria da sacarose presente no mosto.

Em estudos realizados com o fermentado do suco de melão, pesquisadores obtiveram um valor um pouco abaixo, sendo este ($Y_{P/S}$) de 0,46²⁷. Em outro estudo, ao ser produzido um fermentado alcoólico de melancia, observou-se um rendimento em produto de 0,65, mais próximo ao valor encontrado no presente trabalho¹⁰. Essas variações apresentadas nos valores dos parâmetros cinéticos podem ser explicadas por diversos fatores, dentre eles tipo de levedura utilizada no processo, modo de operação do reator, temperatura, tempo de operação, substrato utilizado e outros²⁹.

DESTILADO

Ao final de duas bateladas, desenvolvidas replicando todas as condições de operação, os fermentados produzidos foram misturados, com o intuito de acrescentar volume e permitir a realização do processo de destilação, visando obter o destilado de manga-ba. Na primeira destilação, a aguardente obtida apresentou aparência bastante turva, sendo necessário que houvesse uma nova destilação, mais conhecida como bidestilação. A bidestilação é um processo que consiste em promover duas destilações em sequência, podendo ser efetuadas no mesmo alambique. Com essa técnica, é possível a obtenção de uma bebida mais padronizada, com qualidade diferenciada das aguardentes feitas com apenas uma destilação³⁰.

Ao fim deste processo, com as frações cabeça, corpo e calda devidamente separadas, foi obtido um volume de 800 mL de destilado com graduação alcoólica de 41% (v/v) e aparência límpida, conforme apresentado na Fig. 6.

FIGURA 6—AGUARDENTE DE MANGABA COM GRADUAÇÃO ALCOÓLICA DE 41% (V/V)



O teor alcoólico obtido nesta etapa permite afirmar que o destilado obtido se encontra com este parâmetro dentro da faixa requerida pela legislação brasileira de bebidas³¹. Valores próximos foram encontrados também em trabalhos semelhantes por outros autores. Na produção de aguardentes de banana e abacaxi, foram observados, respectivamente, os teores alcoólicos de 42% (v/v) e 40,4% (v/v)³⁰. Em outro caso, porém, com a produção de uma aguardente também de banana, obteve-se um grau alcoólico de 36°GL³². Outros pesquisadores produziram aguardente de jabuticaba, através da casca e da borra do fermentado de jabuticaba, obtendo um teor alcoólico de 39°GL³³. Esses resultados mostram que a aplicação dos processos de fermentação e de destilação podem ser utilizados para evitar o desperdício de frutos, que muitas

vezes não têm o uso adequado, além da possibilidade de obtenção de produtos com valor agregado.

CONCLUSÃO

Ao fim do processo fermentativo, o teor alcoólico do fermentado de mangaba foi de 10,54%ABV, concluindo-se, por meio da análise cinética, que o comportamento ao longo do tempo de processamento foi o esperado, com formação do produto, por meio do consumo de substrato e variação na concentração celular, conforme as fases estabelecidas para este tipo de fermentação. A partir da análise cinética, verificou-se também o rendimento e a produtividade, sendo alcançado um bom rendimento de 84,01%; e uma produtividade baixa, com valor de $0,866 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$, o que indica que, nas condições estudadas, se faz necessário um tempo maior para atingir a produção desejada.

A bidestilação do fermentado de mangaba permitiu a produção de 500 mL da aguardente de mangaba com graduação alcoólica de 41% (v/v), sendo que este valor se encontra dentro dos limites permitidos pela legislação vigente.

REFERÊNCIAS

1. Lima ILP, Scariot A. Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável da Mangaba. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. 68.p.
2. Santos, JTS, Soares FSC, Soares DSC, Campos AFP, Carne lossi MAG. Avaliação de mangaba liofilizada através de parâmetros físico-químicos. Scientia Plena, v. 8, n. 3 (a), 2012.
3. Gonçalves LGV, Andrade FR, Marimon Junior BH, Schossler TR, Lenza E, e Marimon BS. Biometria de frutos e sementes de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) em vegetação natural na região leste de Mato Grosso, Brasil. Revista de Ciências Agrárias. 2013; 36 (1): 31–40.
4. Siqueira APS. Desenvolvimento fisiológico e avaliação pós-colheita de mangaba (*Harconia speciosa* Gomes). [dissertação]. [Goiânia (GO)]: Universidade Federal de Goiás; 2017. 103 f.
5. Carne lossi MAG, Toledo WFF, Souza DCL, Lira ML, Silva GF, Jalali VRR, Viégas PRA. Conservação pós-colheita de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes). Ciência e Agrotecnologia, 2004; 28:1119-1125
6. Damaso MCT, Couri S. Tecnologia de alimentos. Agência Embrapa de Informação Tecnológica [Internet]. 2018 jun [cited 2018 jun 25]; (1): [about 1 p]. Available from: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT00ofid5sgifo2wyiv80z4s4737dnfr3b.html
7. Paschoalini G, Alcarde VE. Estudo do processo fermentativo de usina sucroalcooleira e proposta para sua otimização. Revista Ciênc & Tecnol. 2009. 16 (32): 59-68.
8. Schmidell W, Lima UA, Aquarone E, Borzani W. Biotecnologia Industrial, Volume 2, Engenharia Bioquímica, 1a ed., São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda., 2001, 541 p. il.

9. Daré, RM. Avaliação De Coeficientes de Rendimento e Modelagem do Processo Fermentativo de Produção de Metanol. [Dissertação]. [São Carlos (SP)] Universidade Federal de São Carlos; 2008. 67 p.
10. Fontan RCI. Cinética Da Fermentação Alcoólica Na Elaboração De Vinho de Melancia. CEPPA , v. 29, n. 2, p. 203-210, jul./dez. 2011.
11. Oliveira LA, Lordelo FS, Tavares JTQ, Cazzeta ML. Elaboração de bebida fermentada utilizando calda residual da desidratação osmótica de abacaxi. Rev. Bras. Tecnol. Agroind. 2012; 6: 702–712
12. Pinto LIF, Araújo MMN, Amaral NM, Melo SCP, Zambelli RA, Pontes DF, Desenvolvimento de bebida alcoólica fermentada obtida a partir de resíduos agroindustriais; p. 3984-3990. In: Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química–COBEQ 2014 [= Blucher Chemical Engineering Proceedings, v.1, n.2]. São Paulo: Blucher, 2015.
13. Vieira CR. *Dossiê Técnico*: Produção de fermentados a partir de frutas, jan. 2012. Disponível em: <<http://sbrc.ibicit.br/dossie-tecnico/downloadsDT/NTY3OQ>>. Acesso em: 30 de maio de 2018.
14. Silveira JC, Busato NV, Costa AOS, Júnior EFC. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. Enciclopédia Biosfera. 2012; 8 (15): 2038-2052.
15. Cancelier A, Capeletto C, Pereira BA, Todescato D, Costelli MC, Silva A, Lopes TJ. Influência de parâmetros de processo na obtenção de bebida fermento-destilada de uva-japão (*Hovenia dulcis* Thunberg). Brazilian Journal of Food Technology. 2013. 16 (1): 59-67.
16. Rizzon LA, Meneguzzo J, Abarzua CE. Elaboração de Vinho Espumante na Propriedade Vitícola. Bento Gonçalves-RS: Embrapa; 2000.
17. Ramos BF. Avaliação Cinética da Fermentação do Mosto de Seriguela (*Spondias purpurea*) em reatores batelada, com e sem agitação, para posterior destilação. [Monografia]. [Sumé (PB)]: Universidade Federal de Campina Grande; 2018. 56 p.
18. Neves LCM. Obtenção da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase utilizando *Saccharomyces cerevisiae* W303-181. [Dissertação]. [São Paulo (SP)]: Universidade de São Paulo; 2003. 284p.
19. Guidini CZ. Fermentação Alcoólica em Batelada Alimentada Empregando *Saccharomyces cerevisiae*. [Dissertação]. [Uberlândia (MG)]: Universidade Federal de Uberlândia; 2013. 127 p.
20. Ferrari FCS. Fatores Operacionais e Cinética do Processo Fermentativo Para Otimização da Produção de Etanol em Escala Industrial. [Dissertação]: Universidade Federal Paulista; 2013. 74 p.
21. Muller JL, Potti KL, Machado MS, Lacerda LV, Bresolin TMB, Podlech PS. Comparison of *Saccharomyces boulardii* growth in an air-lift fermentor and in a shaker. Food Sci. Technol.

22. Brito AFS. Análise cinética e estudo dos parâmetros fermentativos para a produção de hidromel. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos), Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido – Universidade Federal de Campina Grande, Sumé, PB, 2015
23. Barbosa PS, Andrade ES, Jesus JH, Brondani FMM, Vieira R. Análise e Quantificação do Teor Alcoólico do Fermentado Artesanal de Jabuticaba. Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente. 2017 jan:16-32
24. Arruda AR, Casimiro ARS, Garruti, D. S; Abreu FAP. Caracterização físico-química e avaliação sensorial de bebida fermentada alcoólica de banana. Revista ciência agrônômica. 2007; 38 (4): 377-384.
25. Muniz CR, Borges MF, Abreu FAP, Nassu RT, .; FREITAS, C. A. S. Bebidas fermentadas a partir de frutos tropicais. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos (CEPPA). 2002; 20 (2): 309-322
26. Paula B. Produção de fermentado de umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.). [Dissertação]. Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2011. 87F
27. Soares MVLO. et al. Utilização de *Hanseniaspora* sp. no suco de Melão na Fermentação Alcoólica. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2014, Florianópolis/SC. Congresso Brasileiro de Engenharia Química ... Florianópolis: [s.n.], 2014. p. 1-7.
28. Oliveira, L. P. S.; Campelo, D. C. L. A.; Cruz Filho, I. J.; Marques, O. M.; “Desenvolvimento de bebidas fermentadas de ciriguela e cupuaçu: estudo cinético, análises cromatográfica e sensorial.”, p. 1201-1207. In: Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química–COBEQ 2014
29. Almeida MM, Tavares DPSA, Rocha AS, Oliveira LSC, Silva FLH, Mota JC. Cinética da produção do fermentado do fruto do mandacaru. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais. 2006; 8 (1): 35-42.
30. Moro, KIB. Desenvolvimento e Caracterização de Aguardente de Frutas a Base de Banana (*Musa* sp.) e de Suco de Abacaxi (*Ananas comusus* (L) MERRIL). [Dissertação]. [Santa Maria (RS)]: Universidade Federal de Santa Maria; 2016. 87 p.
31. BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009. Regulamenta a Lei registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas.
32. Matos, ME. Produção de Aguardente de Banana por leveduras Isoladas e Seleccionadas Para Síntese de Compostos Voláteis Característicos do Aroma Natural de Banana. [Dissertação]. [Curitiba (PR)]: Universidade Federal do Paraná; 2015. 160 p.
33. Asquieri ER. Silva AGM, Cândido MA. Aguardente de jabuticaba obtida da casca e borra da fabricação de fermentado de jabuticaba. Food Science and Technology, v. 29, n. 4, p. 896-904, 2009.

POTENCIAL DA BAICALINA COMO ANTÍDOTO PARA A RICINA

Samuel de Souza Farias

Universidade Federal de Campina Grande, CDSA, Sumé – PB

Rafael Trindade Maia

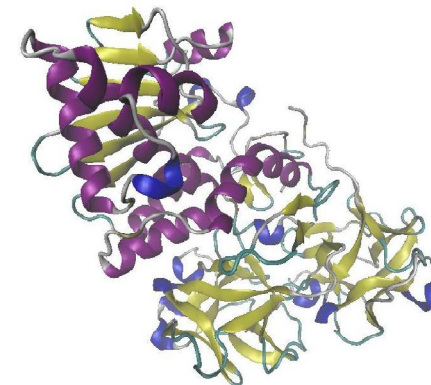
Universidade Federal de Campina Grande, CDSA - Sumé – PB

rafael.rafatrin@gmail.com

INTRODUÇÃO

A ricina faz parte do grupo de proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) do tipo 2, que possui como principal característica a presença de cadeias polipeptídicas divididas em cadeia A e cadeia B. A cadeia A é uma toxina com capacidade de inibir a síntese de proteínas e a cadeia B, uma subunidade com função de facilitar a entrada da cadeia A no interior da célula, de forma a unir-se a glicoproteínas e glicolípido contendo galactosídeos¹ (Fig. 1).

FIGURA 1—VISÃO TRIDIMENSIONAL DA MOLÉCULA DE RICINA



Fonte: PDB-2AAI.

A ricina é uma fitotoxina presente nas sementes de mamona (*Ricinus communis* L., família *Euphorbiaceae*), uma planta que se originou na África, mas atualmente encontra-se distribuída em vários locais do mundo para fins industriais e ornamentais². Mesmo a ricina sendo uma das principais proteínas encontradas nas sementes de mamona, ela representa apenas 2% do peso da semente, sendo que o óleo da mamona representa a maior parte deste peso (60% do peso da semente) e os 38% restantes são compostos solúveis presentes, que incluem aglutininas de *Ricinus*, praticamente um dímero de ricina, mas muito menos tóxico, e também diversas proteínas menores¹.

A ricina se destaca entre as toxinas mais letais encontradas em plantas, visto que uma dose letal de ricina em humanos é supostamente de 5-10 mg/kg por injeção, enquanto a ingestão tem uma dose letal na ordem de 1 a 20 mg/kg. Além disso, a ricina é muito mais fácil de se obter do que outros agentes biológicos considerados de alta capacidade letal, como o antraz e a toxina botulínica, pois sua obtenção e refinamento requer somente o conhecimento básico de técnicas laboratoriais³.

A ricina é classificada como um agente de prioridade da Categoria B pelos Centros dos Estados Unidos para Controle e Prevenção de Doenças (CDC), sendo um dos agentes biológicos com uma das maiores toxicidades conhecidas. Essa toxina pode entrar em contato com o indivíduo por diferentes rotas de intoxicação, incluindo injeção, ingestão (alimentos e água contaminados) e inalação (exposição a aerossóis), sendo que todos eles representam uma grande ameaça do ponto de vista do bioterrorismo⁴.

Diante dessas informações, deve-se salientar a periculosidade que representa tal toxina. Entretanto, a maioria dos casos de intoxicação ocorre por ingestão acidental quando se trata de crianças e animais domésticos; e em casos de ingestão intencional por adultos, geralmente é feita por motivos de suicídio ou,

em alguns raros casos, de tentativa de assassinato. Nestes casos, quando percebida a intoxicação, é necessário tratamento imediato para preservar a vida do paciente e evitar complicações.

O modo como a ricina entra na célula através da membrana celular, alcança os ribossomos e proporciona uma atividade inibidora na síntese de proteínas é um processo complexo⁵. A ricina entra por endocitose na célula, em grande parte através de sítios de ligação da galactose, ocorrendo ligação oportunista por meio da cadeia B para componentes de superfície, que possuem um terminal de galactose; após a sua entrada, ocorre a separação da cadeia A e da cadeia B da ricina⁵. Uma vez no interior da célula, a ricina é internalizada pelos endossomos, uma parte das moléculas da ricina é reciclada e retorna para fora da membrana, outra parte é transportada por endossomos tardios para ser degradada por lisossomos, e uma pequena parte da ricina absorvida é transportada para o complexo de Golgi².

Do complexo de Golgi, a ricina é transportada para o retículo endoplasmático e, por último, é transportada para o citosol, sendo que todo esse processo ocorre de forma lenta, mas apenas um número pequeno de moléculas é suficiente para causar a morte celular³. Após o processo de absorção e o contato com os ribossomos, a cadeia A da ricina promove a remoção de uma adenina específica (despurinação) da porção 28S do ácido ribonucleico ribossomal que está na subunidade 60S, impedindo a ligação do fator de alongamento 2 e a síntese de proteína⁶.

SINTOMAS CLÍNICOS DE INTOXICAÇÃO

A grande maioria das informações disponíveis sobre intoxicação por ricina são de relatos de casos de intoxicação pela ingestão de semente de mamona e casos de testes *in vivo*, que são feitos em ratos de laboratório². A intoxicação por ricina pode apresentar

diferentes sintomas, dependendo da via de acesso, da quantidade de ricina absorvida, da concentração e do tempo decorrido entre o diagnóstico e o tratamento da intoxicação. Os sintomas da intoxicação por ricina normalmente se assemelham aos sintomas de várias doenças comuns⁷.

Em casos da entrada da toxina por via digestiva, o aparecimento dos primeiros sintomas da intoxicação pela ricina ocorre entre 1 a 6 horas após a ingestão, entretanto existem casos em que a ocorrência destes sintomas pode aparecer entre 15 e 45 minutos. Os sintomas mais frequentes são vômito, dor abdominal, diarreia², perda do apetite, hematêmese, ataxia, sialorreia, decúbito, taquicardia⁶, hipotensão, hepatite, pancreatite, nefrite, lesão miocárdica, edema cerebral e supressão da medula óssea³.

Os sintomas de intoxicação pela ricina são um reflexo dos danos que esta substância causa no corpo. O dano causado pela ingestão de ricina pode ser devastador⁸, pois, após a ingestão do extrato da mamona, a ricina começa a danificar o sistema gastrointestinal, causando sérios danos, levando à desidratação e a grave dano visceral. Este dano pode ser explicado pelo fato de a ricina ingerida danificar o epitélio intestinal e, desta forma, afetar os vasos sanguíneos e linfáticos, alcançando o fígado e o baço.

Nos poucos casos registrados de absorção de ricina por via inalatória, os pacientes afetados apresentaram os seguintes sintomas: congestão nasal e de garganta, urticária, pressão torácica e broncoespasmos,³ febre, dor torácica, tosse, dispneia, náusea e artralgia².

No grupo de controle para teste de vacinas antirricina, os camundongos apresentaram lesões macroscópicas, principalmente, nos pulmões e linfonódulos traqueobrônquicos; além disto, tiveram edema perivascular e alveolar grave, bem como uma infiltração neutrofílica misturada com um número pequeno de macrófagos dentro e ao redor dos bronquíolos terminais⁹.

Ainda existem casos de intoxicação cutânea, entretanto, para que isto ocorra, é necessário o contato com a ricina por longos períodos de tempo e em grande quantidade, sendo esse tipo de intoxicação raro. A detecção da ricina no corpo de um paciente intoxicado é essencial para o tratamento, visto que o tratamento imediato poder salvar uma vida. O diagnóstico da intoxicação pela ricina pode ser feito por meio de testes clínicos e por detecção de ricina no sangue e nos fluidos corporais por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA)¹, por radioimunoensaio, por cadeia de polimerase reação (PCR) e por fluorescência resolvida no tempo imunoensaio (TRF)³.

TRATAMENTO DA INTOXICAÇÃO POR RICINA

Como foi dito, o tratamento para intoxicação contra a ricina é um tratamento de suporte, visando à retirada da toxina do organismo antes que ela cause dano fatal. O tratamento consiste no uso de carvão ativado ou lavagem gástrica, que é usado para impedir a absorção da toxina pelo sistema gastrointestinal¹⁰. O tratamento com a lavagem gástrica é susceptível a remoção de uma quantidade significativa de ricina, assim é importante que seja feito pelo menos 1 hora após a ingestão da toxina³. Além desses tratamentos, também pode ser feita a indução ao vômito, sucralfato, dieta suave, intensa fluidoterapia intravenosa e terapia eletrolítica, a depender da ocorrência.

Existem tratamentos em desenvolvimento para a intoxicação por ricina, os quais podem ser divididos em três tipos distintos: imunização passiva pós-exposição, tratamento pós-exposição com moléculas pequenas e imunização profilática. Todos esses novos tipos de tratamentos possuem suas desvantagens, mas o primeiro e o segundo apresentam como desvantagem o fato de que somente são eficazes se aplicados nos pacientes algumas ho-

ras depois da intoxicação e antes do aparecimento dos primeiros sintomas; já o terceiro possui como desvantagem o fato de ser de difícil fabricação e não funcionar sempre como o esperado⁷.

Uma desvantagem que pode ser encontrada no caso do uso de moléculas inibidoras de ricina é que, em sua maioria, são compostos sintéticos com capacidade de inibir a toxicidade da ricina, entretanto podem não ser seguros para o uso¹⁰. Além disso, muitos destes inibidores não demonstraram muita eficácia em tratar a intoxicação pela ricina^[11]. O uso de moléculas inibidoras apresenta o desafio de encontrar moléculas adequadas para um tratamento contra a intoxicação pela ricina, este problema pode ser resolvido pelo uso de moléculas que podem ser encontradas no nosso dia a dia.

Algumas das substâncias naturais que possuem a capacidade de inibição da ricina estão presentes no leite, como a lactose e a galactose, que, em teste *in vitro*, provaram que podem reduzir a disponibilidade da ricina para as células, inibindo assim a sua atividade biológica, mas estes efeitos dependem da concentração tanto das moléculas de ricina quanto das moléculas inibidoras¹⁰. A lactose provoca a inibição da ricina por meio da ligação das suas moléculas às da ricina, desta forma reduzindo a ligação da ricina com os receptores presentes na superfície da célula e aumentando a taxa de dissociação da ricina dos receptores celulares¹². Este tipo de inibição pode ocorrer com a galactose, visto que a ricina liga-se a carbonos na superfície celular, que contém receptores de galactose¹³.

Outra molécula natural que provou ter uma boa capacidade de inibir a ação da ricina foi a baicalina, uma flavona derivada principalmente das raízes da *Scutellaria baicalensis*¹⁴, que interage com a cadeia A da molécula de ricina por redes de pontes de hidrogênio e interações de força eletrostática, proporcionando uma inibição da ação tóxica da ricina, fazendo com que a cadeia A passe por um processo de formação de oligômeros, sendo uma forma de inibição da ricina diferente dos demais inibidores relatados^[11].

Utilizando informações providas do Banco de Dados de Proteínas (PDB – *Protein Data Bank*). Neste experimento, foi utilizada a molécula da entrada 2AAI, que contém a estrutura cristalográfica da ricina.

METODOLOGIA

A técnica de *docking* molecular foi escolhida para este trabalho. *Docking* molecular é a representação computacional de um reconhecimento molecular, que ocorre entre o ligante e a proteína; tal representação simula os vários métodos de encaixe possíveis entre a proteína e o ligante, além de mostrar as formas como são tratadas a colocação do ligante, possibilitar a exploração do espaço conformacional, representar as interações de ligante e proteína e a estimativa da possibilidade de afinidade de ligação.

Os métodos de *docking* molecular se dividem em duas classes de métodos distintos: o proteína-ligante e o proteína-proteína. O sistema de *docking* molecular é composto de duas etapas, sendo a primeira um algoritmo de busca conformacional que possibilita o envolvimento de todos os graus de liberdade do ligante; já a segunda etapa tem como função pontuar e ranquear as possíveis posições espaciais para um determinado composto. Neste estudo, foi utilizado o *docking* do tipo proteína-ligante.

MINIMIZAÇÃO DE ENERGIA

Para otimização da geometria molecular e das condições termodinâmicas, foi necessário que a estrutura passasse por uma minimização de energia, visto que a quantidade de resíduos em regiões favoráveis foi considerada insuficiente para a obtenção dos resultados desejados, de forma que não seria possível obter resultados com a qualidade necessária. A minimização de energia

é uma técnica que usa algoritmos e outros métodos computacionais para melhorar a qualidade do modelo. Para isso, os algoritmos e métodos computacionais buscam conformações que possuem uma menor perturbação entrópica entre as possíveis conformações, desta forma aumentando o número de resíduos em regiões favoráveis.

Para a realização da minimização de energia do modelo proposto, foi utilizado o servidor Yasara (www.yasara.org/minimizationserver.htm). Após a minimização, o modelo final passou pelo processo de validação.

DOCKING MOLECULAR

→ Preparação do receptor (ricina)

O receptor (macromolécula) utilizado para as simulações de *docking* foi o modelo tridimensional refinado da ricina (2AA1) (Fig. 1), o qual foi nomeado de RIC_END. O arquivo foi convertido de *.pdb* para *.pdbqt* e foram adicionados e assinalados parâmetros de carga *Kollman*, assim como hidrogênios foram adicionados à estrutura.

→ Mineração e preparação dos ligantes

Para a realização do experimento de *docking*, foram selecionadas moléculas que tiveram a capacidade inibidora comprovada na literatura, sendo estas: lactose, galactose e baicalina (Tabela 1). As coordenadas atômicas destes ligantes foram adquiridas por meio de arquivos *.mol2* disponíveis na base de dados Zinc (zinc.docking.org). Os ligantes foram assinalados com parâmetros de carga *Gasteiger*, de forma que os seus arquivos foram convertidos para *.pdbqt*, para possibilitar seu uso no programa Autodock 1.5.6.

Os experimentos de simulação de *docking* foram realizados com o uso do programa Autodock 1.5.6, o qual possuía uma gra-

de cúbica de volume 126 x 126 x 126 Å, de modo que a molécula de ricina estivesse no centro da grade cúbica e todas as possíveis ligações que pudessem ocorrer fossem feitas pela simulação de *docking*. Para este experimento, foi escolhido o algoritmo genérico Lamarckiano (LGA) e os parâmetros escolhidos para a simulação foram de 10.000 réplicas, as quais possuíam análises de energia a cada 1.500.000 e 27.000 gerações.

O tamanho populacional escolhido manteve as taxas de mutação em 150 e de *crossing-over* foi de 0,02 e 0,8, respectivamente. O *docking* gerou 10 conformações ranqueadas por energias distintas para cada molécula utilizada. As conformações obtidas foram organizadas, coletadas e analisadas através do uso dos recursos disponibilizados pela opção Autodock tools. As conformações que demonstraram energia de ligação “negativa alta” ou em condições com energia de ligação “negativa” situadas ente -0,5 e -3, além de possuírem um alto potencial de inibição, foram selecionadas.

TABELA 1– COMPOSTOS PARA SIMULAÇÃO DE DOCKING

Nome	Estrutura	Fórmula	Acesso	Base de dados
Baicalin (3)		C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	12153569	ZINC
Baicalein 7-glucuronide		C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	4349040	ZINC
Baicalin (4)		C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	59736941	ZINC
Baicalin		C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	3943903	ZINC

Fonte: Banco de dados ZINC (<http://zinc.docking.org>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

RESULTADOS DO DOCKING ENTRE ISÔMEROS DA BAICALIN COM A RICINA

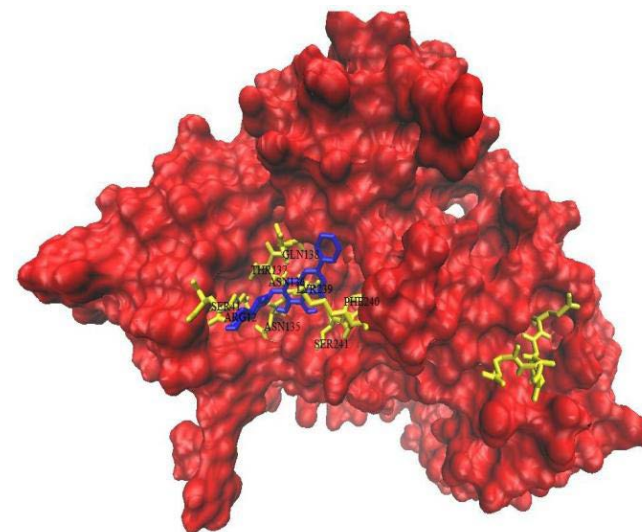
Com a obtenção da molécula refinada, a realização do *docking* molecular obteve resultados satisfatórios, mostrando a eficiência de alguns inibidores citados na literatura. Os resultados do *docking* molecular podem ser vistos na Tabela 2.

TABELA 2— RESULTADOS DOS MELHORES COMPLEXOS OBTIDOS ATRAVÉS DO DOCKING MOLECULAR DO LIGANTE BAICALINA (3) COM A RICINA

Nome	Energia de ligação (kJ/mol)	Constante de inibição (μM)	Energia intermolecular (kcal/mol)
Baicalin (conformação 1)	-5,3	129,24	-7,99
Baicalin (conformação 2)	-4,73	342,55	-7,41
Baicalin (conformação 3)	-4,65	388,64	-7,34

Pode-se notar a facilidade que o ligante possui em formar ligações com a molécula receptora, visto que a energia de ligação foi “negativa”, ou seja, o ligante tem alta afinidade com a molécula alvo. As constantes de inibição apresentaram baixos valores, na ordem de micromolares, o que faz com que os ligantes sejam considerados eficazes na inibição da ricina, devido à capacidade de estabelecer ligações espontâneas com a ricina. A energia intermolecular propulsiona uma ligação mais firme e duradoura, possibilitando que a molécula e o ligante não se desliguem por variações, que pode acontecer no decorrer do tempo. A Fig. 2 mostra a ligação entre a molécula alvo e o ligante, apresentando o complexo Ricina-Baicalina.

FIGURA 2— BAICALINA LIGADA À MOLÉCULA RICINA. VERMELHO: RICINA. AMARELO: RESÍDUOS DO SÍTIO ATIVO. AZUL: LIGANTE.

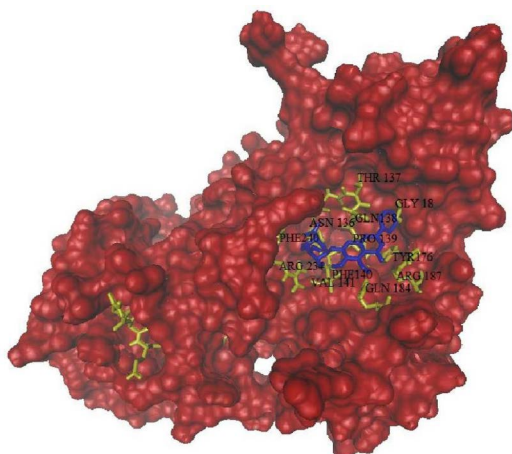


A Tabela 3 mostra os melhores resultados obtidos a partir do *docking* molecular do ligante Baicalin 3 com a molécula ricina. Esse ligante é um dos isômeros da molécula de Baicalin. Assim como o isômero mostrado anteriormente, o Baicalin 3 pode realizar ligação espontânea com facilidade, visto que sua energia de ligação foi apresentada como “negativa”; desta forma, mostra como a capacidade deste isômero de proporcionar uma ligação sem que ocorra uma interferência externa é alta, não necessitando de ajuda para realizar uma ligação, pois a ligação entre a molécula alvo e o ligante propulsiona que ambas as moléculas obtenham estabilidade. As altas constantes de inibição sugerem que o composto seja viável como inibidor, e a energia intermolecular negativa indica uma estabilidade do complexo proteína-ligante. A Fig. 3 mostra a ligação entre a molécula alvo e o ligante.

TABELA 3—RESULTADOS MELHORES OBTIDOS ATRAVÉS DO DOCKING MOLECULAR DO LIGANTE BAICALINA 3 COM A RICINA

Nome	Energia de ligação (kJ/mol)	Constante de inibição (μM)	Energia intermolecular (kcal/mol)
Baicalin 3 (conformação 1)	-4,95	237,37	-7,63
Baicalin 3 (conformação 2)	-4,7	360,75	-7,38
Baicalin 3 (conformação 3)	-4,93	244,47	-7,61

FIGURA 3—BAICALINA 3 LIGADA À RICINA. VERMELHO: RICINA. AMARELO: SÍTIOS DE LIGAÇÃO ENTRE RICINA E O LIGANTE. AZUL: LIGANTE.



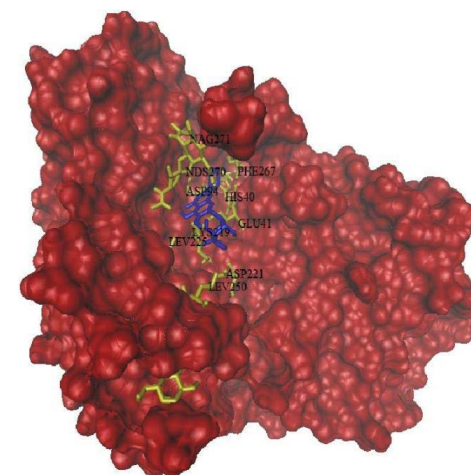
Os resultados apontados na Tabela 4 apontam os melhores resultados alcançados no *docking* molecular entre o ligante baicalin-7-gluturode, sendo este um isômero da molécula de baicalin, e a molécula RIC_END. Os resultados revelaram que, assim como os demais isômeros de baicalin, este apresentou tanto energia de ligação “negativa”, que proporciona uma ligação espontânea entre o ligante e molécula alvo, quanto energia intermolecular

e constante de inibição satisfatória. Entretanto a conformação 1 apresentou resultados muito abaixo do desejado, tornando-a não viável para ser utilizada como inibidora. Na Fig. 4, observa-se a interação entre a Baicalina 7 gluturode com a ricina.

TABELA 4—RESULTADOS MELHORES OBTIDOS ATRAVÉS DO DOCKING MOLECULAR DO LIGANTE BAICALINA 7 GLUTURODE COM O RECEPTOR RICINA

Nome	Energia de ligação (kJ/mol)	Constante de inibição (μM)	Energia intermolecular (kcal/mol)
Baicalin 7 gluturode (conformação 1)	-3,26	4,08	-5,94
Baicalin 7 gluturode (conformação 2)	-4,86	273,18	-7,55
Baicalin 7 gluturode (conformação 3)	-4,43	564,41	-7,12

FIGURA 4—DOCKING ENTRE BAICALIN 7 GLUTURODE E RICINA. VERMELHO: RICINA. AMARELO: SÍTIOS DE LIGAÇÃO ENTRE RICINA E O LIGANTE. AZUL: LIGANTE



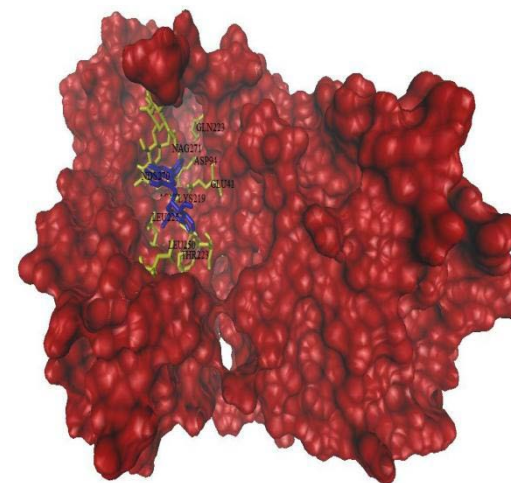
A Tabela 5 mostra os melhores resultados obtidos através do uso do *docking* molecular do ligante nomeado como Baicalin 4, sendo este, assim como os anteriores, um isômero da molécula de baicalin e a molécula RIC-END. Este ligante, assim como os demais isômeros de baicalin utilizados anteriormente, apresentou valores de energia de ligação que tornam a ligação espontânea possível com relativa facilidade, além de valores de constante de inibição mais elevados do que os demais isômeros, entretanto somente em duas conformações, sendo a conformação 2 a que apresentou a menor constante de inibição ainda considerada viável. No caso da energia intermolecular, este apresentou valores próximos dos valores encontrados nos demais isômeros de baicalin.

TABELA 5—RESULTADOS MELHORES COMPLEXOS OBTIDOS ATRAVÉS DO DOCKING MOLECULAR DO LIGANTE BAICALIN 4 COM O RECEPTOR RICINA

Nome	Energia de ligação (kJ/mol)	Constante de inibição (μM)	Energia intermolecular (kcal/mol)
Baicalin 4 (conformação 1)	-4,34	654,49	-7,03
Baicalin 4 (conformação 2)	-5,47	97,94	-8,7
Baicalin 4 (conformação 3)	-4,19	846,0	-6,88

No geral, a Baicalin 4 apresentou resultados satisfatórios como inibidor, provando sua eficácia, assim como mostrado na literatura, e tornando-o possível inibidor em potencial para a intoxicação por ricina. A Fig. 5 mostra a ligação entre a molécula alvo e o ligante.

FIGURA 5—DOCKING ENTRE BAICALIN 4 LIGADA À RICINA. VERMELHO: RICINA. AMARELO: RESÍDUOS DO SÍTIOS DE LIGAÇÃO. AZUL: LIGANTE



É importante ressaltar que a ricina é uma toxina que provoca a inibição da síntese proteica, a qual, após a entrada na célula via endocitose, provoca a morte da célula por inativação dos ribossomos, e com isso inibe a produção de proteínas pela célula¹⁵. Por possuir esta característica, a maioria dos inibidores e formas de tratamentos desenvolvidos visam impedir a entrada da ricina na célula, de modo a interferir nos sítios de ligação entre a célula e o ligante¹⁰. Mas a forma de inibição do baicalin não visa impedir a molécula de ricina de entrar na célula, pois não tem como alvo os sítios de ligação presentes na cadeia B, os quais são responsáveis pela ligação da ricina à célula, mas possuem como alvo sítios de ligação da cadeia A, interferindo diretamente com a toxina.

A Baicalina e seus isômeros foram escolhidos após a verificação na literatura, mostrando possuir baixa toxicidade para o

organismo, pois é preciso um limite alto para chegar a uma dose fatal¹⁶. A característica apresentada o torna viável como inibidor, pois não seria viável seu uso se não apresentasse essas características, visto que o ligante não pode ser capaz de causar dano às células; e pelo fato de possuir baixa toxicidade, sua administração torna-se mais fácil e segura.

Os resultados obtidos com o *docking* molecular podem ser vistos como uma constatação da eficiência do Baicalin como inibidor da ricina, por meios computacionais. Estes resultados também podem ser explicados pelo efeito que a molécula de baicalin demonstrou sobre a ricina em testes de laboratório, os quais demonstraram um mecanismo de ação complexo através de sua ligação com a ricina¹¹.

Na literatura, o baicalin mostrou capacidade de inibição deste ligante e foi notado que possui a capacidade de induzir a toxina presente na cadeia A para formação oligômeros. Assim o baicalin exerce proteção direta contra a ricina, além de interferir na cristalização da cadeia A da ricina¹¹. Esta capacidade pode ser percebida nos resultados do *docking* pela energia de ligação, a qual mostra uma relativa facilidade para a ocorrência de uma ligação espontânea. Tal energia mostra que a ligação do baicalin com a molécula de ricina é uma ligação estável, de forma que isto pode mostrar que, para ambas as moléculas, a ligação é favorável. Além disso, as energias intermoleculares apresentadas nos resultados demonstraram uma ligação forte entre a molécula da ricina e a do baicalin, podendo ser um indicativo de que a reação, além de ser termodinamicamente favorável, possui ligações fortes e duráveis.

Pelo fato de a baicalina possuir uma forma de ligação diferenciada da galactose e da lactose, que serão apresentados neste estudo, podemos dizer que este tipo de ligação diferenciada influencia o comportamento dessa molécula. Isso possibilita uma forma de inibição completamente distinta dos demais inibidores

vistos neste trabalho, o que é evidenciado em estudo prévio¹¹, no qual foi notado que o baicalin se liga à cadeia A da ricina e é posicionado em interfaces positivas altamente carregadas. Desta forma, liga duas cadeias A da ricina relacionando-as por um eixo helicoidal cristalográfico, diminuindo assim drasticamente o número de sítios ativos presentes na toxina, transformando-as em oligômeros menos ativos.

Entretanto, a eficiência demonstrada no *docking* molecular pode ser alterada no experimental, visto que o baicalin possui uma baixa solubilidade em água e uma baixa biodisponibilidade via oral¹⁶. Desta forma, a via de administração pode alterar a eficiência do baicalin na inibição da ricina, de modo que, em experimentos práticos, podem ocorrer resultados que podem diferir.

Entretanto os resultados obtidos pelo *docking* molecular mostraram que, sem a realização de uma ligação entre suas cadeias A de moléculas de ricina, existe a ocorrência de uma forte inibição, de forma que, mesmo sem a interação de diferentes moléculas de ricina, a inibição é possível. A eficiência da molécula de baicalin como inibidor é viável, pois tanto em estudos laboratoriais quanto em testes computacionais este ligante demonstrou ótimos resultados, os quais o tornam um incrível inibidor em potencial para o tratamento da intoxicação por ricina.

Os dados obtidos neste estudo podem ser úteis para estudos futuros *in silico*, tais como estudos de dinâmica molecular, simulações quânticas, design racional de fármacos, etc. Alterações nestes isômeros podem ser também realizadas com o intuito de desenvolver análogos destes isômeros da baicalina que potencializem a atividade de inibição da ricina.

Experimentos *in vivo* e *in vitro* também são necessários para confirmar as evidências computacionais aqui obtidas. Os isômeros da baicalina, ou algum análogo, podem ser uma opção de tratamento. Estas moléculas podem ser alvos de desenvolvimento de

nanopartículas que otimizem o *drug delivery*, aumentando assim a eficácia farmacológica e terapêutica.

Como a Baicalin já é produzida para fins comerciais, devido a diversas propriedades farmacológicas e cosméticas, torna-se um composto promissor e acessível para uso medicamentoso em casos de intoxicação por ricina.

O *docking* molecular mostrou-se uma técnica interessante para prospecção de inibidores da ricina. A metodologia aqui utilizada pode ser um *pipeline* para busca de outras substâncias que inibam a ricina ou até mesmo para estudos de outras toxinas.

CONCLUSÃO

Neste estudo, encontraram-se evidências *in silico* do potencial dos ligantes (isômeros da baicalina) como inibidores da molécula de ricina nos resultados obtidos, nos quais os ligantes demonstraram sua eficiência em inibir a ricina.

Pode-se perceber que as moléculas de baicalina, baicalina 3, baicalina 4 e baicalin-7-gluturode, apresentaram resultados significativos, de forma que estes ligantes possuem facilidade de gerar ligação estável e uma capacidade de inibição potente. Desta forma, tais ligantes apresentaram um notável potencial como inibidor da ricina, o maior encontrado neste estudo, tornando-os excelentes na tarefa de inibição da intoxicação pela molécula de ricina, podendo talvez fazer parte da composição de antídotos.

REFERÊNCIAS

1. Cook DL, David J, Griffiths GD. Retrospective Identification of Ricin in Animal Tissues Following Administration by Pulmonary and Oral Routes. 2007 Toxicology. 2006 Jun;223(1-2):61-70.
2. Anadón PR, Martínez-Larrañaga, MR. Ricina: una fitotoxina de uso potencial como arma. Revista de Toxicología. 2004 jun;21(2-3):51-63.
3. Spivak L, Hendrickson RG. Ricin. Crit Care Clin 2005 out;21(4):815-24.
4. Zhao S, Liu WS, Wang M, et al. Detection of Ricin Intoxication in Mice Using Serum Peptide Profiling by MALDI-TOF/MS. International Journal of Molecular Sciences. 2012 Out;13(10):13704-12.
5. Lord J, Michael R, Lynne M, et al. Ricin: structure, mode of action, and some current applications. The FASEB Journal. 1994 Fev;8(2):201-8.
6. Fonseca NBS, Blanco, BS. Toxicidade da ricina presente nas sementes de mamona. Semina: Ciências Agrárias. 2014 mai/jun;35(3):1415-24.

7. Marconescu PS. et al. Intradermal administration of RiVax protects mice from mucosal and systemic ricin intoxication. NIH Public Access, Dallas, 2011 jul;28(32):5315-22.
8. Nunez OF, Lopez P, Anthony , et al. Ricin Poisoning after Oral Ingestion of Castor Beans: A Case Report and Review of the Literature and Laboratory. Out 2017;53(5):1-5.
9. Roy, CJ et al. Thermostable ricin vaccine protects rhesus macaques against aerosolized ricin: Epitope-specific neutralizing antibodies correlate with protection. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2015 Mar;112(12):3782-7.
10. Rasooly R, Xiaohua HE, Friedman M. Milk Inhibits the Biological Activity of Ricin. Journal of Biological Chemistry. 2012 Mar; 287(33): 27924-9.
11. Dong J, et al. Baicalin Inhibits the Lethality of Ricin in Mice by Inducing Protein Oligomerization. The Journal of Biological Chemistry. 2015 May 15;290(20):12899-907
12. Lumor, SE. et al. Assessment of the Inhibition of Ricin Toxicity by Lactose in Milk. Journal of Food Protection. 2013 Mar;76(12):2037-9.
13. Bradberry, S. Ricin and Abrin. Medicine. 2016 Feb; 44(2):109-10.
14. Guo AJY. Baicalin, a Flavone, Induces the Differentiation of Cultured Osteoblasts. An action via the wnt/ β -catenin signaling pathway. Journal of Biological Chemistry. 2012 Feb: 287(9):6958-8.
15. Alexander J, et al. Ricin (from *Ricinus communis*) as undesirable substances in animal feed. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. The EFSA Journal. 2008 Jun:726,1-38.
16. Chen H, et al. Exploring Therapeutic Potentials of Baicalin and Its Aglycone Baicalin for Hematological Malignancies. NIH Public Access. 2014 nov; 354(1):5-11.

Formato *15x21 cm*
Tipologia *Alegreya*
Nº de Pág. 289

Editora da Universidade Federal de Campina Grande- EDUFCG

