

As ciências biológicas e os progressos que beneficiam a sociedade 2

CLÉCIO DANILO DIAS DA SILVA
DANIELE BEZERRA DOS SANTOS
(ORGANIZADORES)


Ano 2023

As ciências biológicas e os progressos que beneficiam a sociedade 2

CLÉCIO DANILO DIAS DA SILVA
DANIELE BEZERRA DOS SANTOS
(ORGANIZADORES)


Ano 2023

Editora chefe

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Editora executiva

Natalia Oliveira

Assistente editorial

Flávia Roberta Barão

Bibliotecária

Janaina Ramos

Projeto gráfico

Camila Alves de Cremo

Ellen Andressa Kubisty

Luiza Alves Batista

Nataly Evilin Gayde

Thamires Camili Gayde

Imagens da capa

iStock

Edição de arte

Luiza Alves Batista

2023 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do texto © 2023 Os autores

Copyright da edição © 2023 Atena

Editora

Direitos para esta edição cedidos à Atena Editora pelos autores.

Open access publication by Atena Editora



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

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

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

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

Conselho Editorial

Ciências Biológicas e da Saúde

Profª Drª Aline Silva da Fonte Santa Rosa de Oliveira – Hospital Federal de Bonsucesso

Profª Drª Ana Beatriz Duarte Vieira – Universidade de Brasília

Profª Drª Ana Paula Peron – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

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

Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas

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

Profª Drª Camila Pereira – Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Cirênio de Almeida Barbosa – Universidade Federal de Ouro Preto

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

Profª Drª Danyelle Andrade Mota – Universidade Tiradentes

Prof. Dr. Davi Oliveira Bizerril – Universidade de Fortaleza

Profª Drª Débora Luana Ribeiro Pessoa – Universidade Federal do Maranhão

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

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

Profª Drª Elizabeth Cordeiro Fernandes – Faculdade Integrada Medicina

Profª Drª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília

Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina

Profª Drª Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira

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

Profª Drª Fernanda Miguel de Andrade – Universidade Federal de Pernambuco

Profª Drª Fernanda Miguel de Andrade – Universidade Federal de Pernambuco

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

Profª Drª Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras

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

Prof. Dr. Guillermo Alberto López – Instituto Federal da Bahia

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

Profª Drª Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco

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

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

Prof. Dr. Jesus Rodrigues Lemos – Universidade Federal do Delta do Parnaíba–UFDPAr

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

Prof. Dr. José Aderval Aragão – Universidade Federal de Sergipe

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

Profª Drª Juliana Santana de Curcio – Universidade Federal de Goiás

Profª Drª Kelly Lopes de Araujo Appel – Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal

Profª Drª Larissa Maranhão Dias – Instituto Federal do Amapá

Profª Drª Livia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás

Profª Drª Luciana Martins Zuliani – Pontifícia Universidade Católica de Goiás

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

Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande

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

Profª Drª Maria Tatiane Gonçalves Sá – Universidade do Estado do Pará

Prof. Dr. Maurilio Antonio Varavallo – Universidade Federal do Tocantins

Prof. Dr. Max da Silva Ferreira – Universidade do Grande Rio

Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma

Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá

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

Profª Drª Regiane Luz Carvalho – Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino

Profª Drª Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora

Profª Drª Sheyla Mara Silva de Oliveira – Universidade do Estado do Pará

Profª Drª Suely Lopes de Azevedo – Universidade Federal Fluminense

Profª Drª Taísa Ceratti Treptow – Universidade Federal de Santa Maria

Profª Drª Vanessa da Fontoura Custódio Monteiro – Universidade do Vale do Sapucaí

Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa

Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Profª Drª Welma Emidio da Silva – Universidade Federal Rural de Pernambuco

As ciências biológicas e os progressos que beneficiam a sociedade 2

Diagramação: Camila Alves de Cremo
Correção: Maiara Ferreira
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores
Organizadores: Clécio Danilo Dias da Silva
Daniele Bezerra dos Santos

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)	
C569	As ciências biológicas e os progressos que beneficiam a sociedade 2 / Organizadores Clécio Danilo Dias da Silva, Daniele Bezerra dos Santos. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2023. Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web Inclui bibliografia ISBN 978-65-258-1821-4 DOI: https://doi.org/10.22533/at.ed.214230410 1. Ciências biológicas. I. Silva, Clécio Danilo Dias da (Organizador). II. Santos, Daniele Bezerra dos (Organizadora). III. Título. CDD 570
Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166	

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

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.

DECLARAÇÃO DA EDITORA

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

As ciências biológicas têm sido a vanguarda de uma jornada de descobertas que remodelaram profundamente nossa visão da vida e do mundo natural. Do micromundo das estruturas moleculares ao macrocosmo dos ecossistemas complexos, essa abrangente disciplina tem construído uma base sólida para avanços que ecoam positivamente em toda a sociedade. Ela se estabelece como a força motriz que impulsiona o progresso, deixando uma marca indelével em nosso planeta. Esses avanços reverberam em melhorias substanciais na saúde humana, na nutrição, na qualidade do ambiente e na nossa compreensão intrínseca da vida. À medida que exploramos continuamente as fronteiras da biologia, traçamos um caminho luminoso em direção a um futuro mais saudável e sustentável, onde a ciência se torna a luz que guia nosso desenvolvimento.

Com grande prazer, apresentamos o segundo volume do E-Book “Avanços nas Ciências Biológicas e seus Impactos na Sociedade”. Este volume é constituído por oito capítulos cuidadosamente elaborados por professores, pesquisadores, estudantes de graduação e pós-graduação de várias regiões do Brasil. O E-Book explora de maneira profunda tópicos relacionados à Biotecnologia e Saúde, que vão desde a aplicação de tecnologias emergentes na indústria de alimentos até estudos de casos médicos e veterinários. Durante os capítulos, ressalta-se de maneira marcante o papel vital da inovação tecnológica nas Ciências Biológicas e da Saúde.

Cada capítulo é uma peça essencial deste mosaico de conhecimento que busca entender e aplicar os princípios da biologia para melhorar nossa qualidade de vida. Este E-Book não apenas enriquecerá sua compreensão, mas também o instigará a explorar as fascinantes áreas das Ciências Biológicas e a forma como elas se entrelaçam com a nossa existência. Esteja convidado a embarcar nessa jornada conosco, a mergulhar e descobrir como as Ciências Biológicas moldam nosso presente e iluminam nosso caminho rumo a um futuro brilhante e sustentável.

Clécio Danilo Dias da Silva
Daniele Bezerra dos Santos

CAPÍTULO 1 1**APLICAÇÃO DE TECNOLOGIA EMERGENTE NA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS**

Luana de Araújo Nogueira Santiago
 Luana Regina Pereira Alves
 Raphael Sanzio Pimenta
 Glêndara Aparecida de Souza Martins
 Beatriz Rodrigues Santa Rosa
 Alex Fernando de Almeida
 Antônio José de Sousa Caminha
 Elisangela Santos Reis de Oliveira
 Ana Karla Rodrigues Dos Santos
 Jucimara Silva
 Maria Luciana Barbosa Mendes

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.2142304101>

CAPÍTULO 2 12**DETECÇÃO DE CORONAVÍRUS EM SUPERFÍCIES DE UM CENTRO DE TRIAGEM E DIAGNÓSTICO ATRAVÉS DOS MÉTODOS RT-PCR E ANTÍGENO**

Bianca Picinin Gusso
 Alexandre Lemos de Souza

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.2142304102>

CAPÍTULO 3 22**PROGRAMA DE MEDICINA VETERINÁRIA INTEGRATIVA: AVALIAÇÃO DE ÓLEO OZONIZADO NO CONTROLE DE VERMINOSES EM EQUINOS**

Ana Luiza Dalava Carone
 Maria Carolina Pansanato José
 Mariza Fordellone Rosa Cruz
 Ana Paula Millet Evangelista dos Santos
 Celmira Calderón
 Júlia Diehl Marcio
 Luciane Holsback Silveira Fertoni
 André Luiz Paulin
 Breno Fernandes
 Matheus de Oliveira Dini Nascimento
 Diego Resende Rodrigues
 Ellen de Souza Marquez

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.2142304103>

CAPÍTULO 4 31**EFEITO DO USO DE ÓLEO OZONIZADO ORAL EM SUÍNOS NO CONTROLE DE PARASITAS GASTROINTESTINAIS**

Júlia Diehl Marcio
 Mariza Fordellone Rosa Cruz
 Camila Simpionato Pavin
 Matheus da Silva Negrelli

Ana Luiza Dalava Carone
 Maria Carolina Pansanato José
 Diego Resende Rodrigues
 Luciane Holsback Silveira Fertoni
 Ana Paula Millet Evangelista dos Santos
 Celmira Calderón
 Ellen de Souza Marquez
 Flávia Debiagi

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.2142304104>

CAPÍTULO 5 41

CROMOMICOSE PODAL: UM RELATO DE CASO

Patrícia Maria Barbiero

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.2142304105>

CAPÍTULO 6 48

TECNOLOGIA ENZIMÁTICA NA SEGURANÇA ALIMENTAR (BIOSSENSORES)

Antônio José de Sousa Caminha
 Elisangela Santo Reis de Oliveira
 Alex Fernando de Almeida
 Abraham Damian Giraldo Zuniga
 Ana Karla Rodrigues Dos Santos
 Luana de Araújo Nogueira Santiago Santos
 Beatriz Rodrigues Santa Rosa
 Luana Regina Pereira Alves
 Dark Luzia dos Santos Neto
 Maria Luciana Barbosa Mendes

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.2142304106>

CAPÍTULO 7 60

PRODUÇÃO DA CERVEJA ARTESANAL: APLICAÇÃO DAS ENZIMAS NO PROCESSO DE PRODUÇÃO

Beatriz Rodrigues Santa Rosa
 Ana Karla Rodrigues Dos Santos
 Antônio José de Sousa Caminha
 Elisangela Santo Reis de Oliveira
 Luana de Araújo Nogueira Santiago
 Luana Regina Pereira Alves
 Alex Fernando de Almeida
 Sergio Andres Villalba Morales

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.2142304107>

CAPÍTULO 8 77

ADAPTATION AND CONTINUOUS CULTIVATION OF MICROORGANISMS USED IN THE BIOLEACHING OF SULPHIDE MINERALS: A BIOTECHNOLOGICAL APPROACH

Luis Gonzaga Santos Sobral

Andriela Dutra Norberto de Oliveira
Amandha Gomes Tavares de Miranda
Naiara Soares Bello
Armando Lucas Cherem da Cunha



<https://doi.org/10.22533/at.ed.2142304108>

SOBRE OS ORGANIZADORES 89

ÍNDICE REMISSIVO 90

APLICAÇÃO DE TECNOLOGIA EMERGENTE NA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

Data de submissão: 09/08/2023

Data de aceite: 02/10/2023

Luana de Araújo Nogueira Santiago

Universidade Federal do Tocantins-UFT
Palmas - Tocantins
<http://lattes.cnpq.br/8692598507249516>

Luana Regina Pereira Alves

Universidade Federal do Tocantins-UFT
Palmas - Tocantins
<http://lattes.cnpq.br/1225108605600848>

Raphael Sanzio Pimenta

Universidade Federal do Tocantins-UFT
Palmas - Tocantins
<http://lattes.cnpq.br/6513910004717747>

Glêndara Aparecida de Souza Martins

Universidade Federal do Tocantins-UFT
Palmas - Tocantins
<http://lattes.cnpq.br/5998926336408017>

Beatriz Rodrigues Santa Rosa

Universidade Federal do Tocantins-UFT
Palmas – Tocantins
<https://lattes.cnpq.br/6263052491361800>

Alex Fernando de Almeida

Universidade Federal do Tocantins-UFT
Palmas - Tocantins
<http://lattes.cnpq.br/3042922895338679>

Antônio José de Sousa Caminha

Universidade Federal do Tocantins-UFT
Palmas – Tocantins
<http://lattes.cnpq.br/2647162881176317>

Elisangela Santos Reis de Oliveira

Universidade Federal do Tocantins-UFT
Palmas – Tocantins
<http://lattes.cnpq.br/9806120763323839>

Ana Karla Rodrigues Dos Santos

Universidade Federal do Tocantins-UFT
Palmas - Tocantins
<http://lattes.cnpq.br/6022052230588791>

Jucimara Silva

Universidade Federal do Tocantins-UFT
Palmas – Tocantins
<http://lattes.cnpq.br/7587227064682345>

Maria Luciana Barbosa Mendes

Universidade Federal do Tocantins-UFT
Palmas – Tocantins
<http://lattes.cnpq.br/1924429289781505>

RESUMO: Uma gama de enzimas produzidas industrialmente possui aplicação na produção, conservação e modificação de produtos animais e vegetais, como na produção de alimentos, medicamentos e na produção de derivados de matérias-primas animais e vegetais, como por exemplo, os bioativos. Esses compostos bioativos, também são amplamente utilizados na indústria, contemplando a possibilidade de aplicação em produtos como leite, bebidas

variadas, carnes e também de panificação e podem ser extraídos por meio de aplicação de enzimas. Existem alguns fatores que podem afetar a atividade enzimática, como a temperatura, pH e concentração de substrato. Nesse sentido, cada técnica enzimática para obtenção de compostos bioativos possui uma metodologia. A utilização de enzimas para obtenção de compostos bioativos tem se destacado, o que requer novos estudos para enfim estabelecer-se comercialmente. Em contrapartida, o processo enzimático apresenta alguns gargalos que necessita de estudos e planejamento, pois é um processo de alto custo, uma vez que é necessária a produção e purificação das enzimas a serem aplicadas e suas condições devem ser bem delimitadas, uma vez que enzimas são altamente sensíveis e atuam em faixa de temperatura e pH específicos.

PALAVRAS-CHAVE: Aplicação Enzimática; Bioativos; Tecnologia Emergente.

APPLICATION OF EMERGING TECHNOLOGY IN THE EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS

ABSTRACT: A range of industrially produced enzymes are used in the production, conservation and modification of animal and vegetable products, such as in the production of food, medicines and in the production of derivatives of animal and vegetable raw materials, such as bioactives. These bioactive compounds are also widely used in industry, contemplating the possibility of application in products such as milk, various beverages, meats and also bakery and can be extracted through the application of enzymes. There are some factors that can affect enzymatic activity, such as temperature, pH and substrate concentration. In this sense, each enzymatic technique for obtaining bioactive compounds has a methodology. The use of enzymes to obtain bioactive compounds has been highlighted, which requires further studies to finally establish itself commercially. On the other hand, the enzymatic process presents some bottlenecks that require studies and planning, since it is a high cost process, since the production and purification of the enzymes to be applied is necessary and its conditions must be well delimited, since enzymes are highly sensitive and act in a specific temperature and pH range.

KEYWORDS: Enzymatic Application; Bioactives; Emerging Technology.

INTRODUÇÃO

A enzima é um catalisador biológico que desempenha um papel essencial no processo de aceleração das reações bioquímicas em organismos vivos (ROBINSON, 2015). Um catalisador que tem o potencial de promover reações de hidrólise, oxidação e de síntese (TIANFEI, 2020).

A aplicação comercial das enzimas é consideravelmente vasta e de fundamental importância, haja vista as inúmeras possibilidades de utilização nos processos como um eficiente catalisador (ROBINSON, 2015).

Sob essa perspectiva, estuda-se sobre as suas variadas aplicações, como a tecnologia baseada na utilização de enzimas. Segundo TIANFEI (2020), entende-se como tecnologia enzimática, a catálise formada pela utilização de microrganismos para produzir enzimas, isso pode ocorrer também pela adição das mesmas em um recipiente de reação

específico. A aplicação desse tipo de tecnologia demonstra a alta eficiência e segurança nos processos.

Além disso, são alternativos consideravelmente mais sustentáveis no processo de obtenção de extratos bioativos, especialmente, os direcionados para a indústria de alimentos (GRUZ *et al.*, 2013). Cientificamente, esses compostos bioativos são substâncias que possuem atividade biológica (GUAADAQUI *et al.*, 2014).

Esses compostos bioativos, também são amplamente utilizados na indústria, contemplando a possibilidade de aplicação em produtos como leite, bebidas variadas, carnes e também de panificação. Tecnicamente, essa alternativa permite que as indústrias tenham maior abrangência nas aplicações, com o intuito de reformular produtos variados, aumentando a oferta de produtos mais saudáveis e suprir a demanda comercial (CHAGAS *et al.*, 2020).

Considerando os processos tradicionais, a principal etapa para obter compostos bioativos é por meio da metodologia de extração, a adesão está associada principalmente em virtude do alto rendimento e custos de produção relativamente baixos. Entretanto, existem métodos mais eficientes e sustentáveis que são considerados não convencionais, como a extração por ultrassom, pulso elétrico e micro-ondas. Haja vista a sua eficiência, os métodos tradicionais são agregados a tecnologias para proporcionar melhores resultados (LARLOS-CRUZ *et al.*, 2019).

Uma dessas tecnologias amplamente utilizadas encontra-se a tecnologia enzimática. Quanto a esta técnica, é essencial que a indústria opte por métodos que atendam de forma equilibrada alguns requisitos como a eficiência do processo, a qualidade do produto, os custos e que sejam alternativas mais sustentáveis (WEN *et al.*, 2020).

Em virtude da alta demanda nos setores de alimentos, farmacêuticos e nutracêuticos percebe-se a intensificação e necessidade de extrair bioativos utilizando métodos variados, com o intuito de obter um composto puro e com melhores rendimentos. Dentre muitas alternativas utilizadas durante esse processo, encontra-se a opção por enzimas. Considerando a extração a partir de um material vegetal, essas enzimas auxiliam na liberação desses bioativos, garantindo um procedimento otimizado e eficiente. Mesmo que as tecnologias enzimáticas para obtenção de compostos bioativos já sejam utilizadas há muitos anos, ainda assim, percebe-se a importância em aperfeiçoar algumas técnicas com o intuito de reduzir o tempo gasto durante o processo, aumentar o rendimento e tornar os custos do método mais vantajoso (MARATHE *et al.*, 2019).

Pensando nisso, algumas técnicas enzimáticas foram desenvolvidas e são constantemente estudadas com o intuito de melhorar as condições dos processos para obtenção de bioativos, a título de exemplo, a extração assistida por enzima (EAE), extração enzimática assistida por ultrassom (UAEE), extração supercrítica assistida por enzima (EASCFE), extração assistida por enzima por líquidos iônicos (ILEAE) e extração enzimática assistida por alta pressão (HPAEE). Essas alternativas comprovam a efetividade quanto

a melhores rendimentos dos compostos extraídos, redução de custos nos processos, redução no tempo de execução e também, é uma garantia de metodologia sustentável (MARATHE *et al.*, 2019).

ENZIMAS UTILIZADAS EM PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

Uma gama de enzimas produzidas industrialmente possui aplicação na produção, conservação e modificação de produtos animais e vegetais, como na produção de alimentos, medicamentos e na produção de derivados de matérias-primas animais e vegetais, como por exemplo, os bioativos.

Enzimas como, celulasas, pectinases e proteases são as principais proteínas que atuam na degradação de compostos como paredes celulares de plantas e vegetais. Esta degradação facilita a extração de compostos bioativos (BEG *et al.*, 2001; BHANJA *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2006).

A celulase é a terceira enzima mais utilizada em escala industrial. Possui potencial para aplicação no processamento de algodão, alimentos, nas indústrias de papel, bem como na alimentação animal e na produção de detergentes, além de serem utilizadas na produção de etanol a partir da biomassa. Essas enzimas são formadas por várias unidades de glicose unidas entre si através de ligações químicas, responsáveis pela degradação da celulose, principal composto presente nas células vegetais, tendo três enzimas como parte desse grupo: endoglucanases, exoglucanases e beta-glicosidases. (CASTRO & PEREIRA, 2010; ZANCHETTA, 2012; GUEIROS *et al.*, 2020).

As pectinases formam um grupo de enzimas que degradam substâncias pécicas, ou seja, elas quebram a pectina, um polissacarídeo encontrado na parede celular vegetal, por meio de reações de hidrólise, transeliminção e desesterificação. São produzidas por plantas, fungos filamentosos, bactérias e leveduras, e algumas das aplicações destas enzimas nas indústrias de alimentos incluem amadurecimento de frutas, clarificação e redução de viscosidade em sucos de frutas. (SANTI *et al.*, 2014; FAVELA-TORRES *et al.*, 2005).

Dentre as enzimas de interesse comercial, as proteases têm como principal função a quebra de ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas em reações de clivagem de proteínas, atuando nas suas ligações peptídicas e agindo por meio da hidrólise. Algumas características das proteases podem classificá-las em diferentes grupos, essas características incluem: sob qual pH a atividade da protease ocorre de maneira mais eficiente, as substâncias presentes em seu sítio ativo, em quais tipos de ligações químicas ou em qual local da ligação irão ocorrer as clivagens realizadas por cada protease. Como fonte, as proteases podem ser encontradas em plantas, animais e microrganismos. Em plantas geralmente essas enzimas se encontram no látex e nas sementes dos vegetais.

MECANISMOS DE AÇÃO ENZIMÁTICA PARA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

O mecanismo de extração por enzimas é uma técnica amplamente utilizada para auxiliar no processo de quebra de ligações complexas dos compostos bioativos presentes nos materiais vegetais. As etapas do mecanismo consistem na ligação da enzima ao substrato, através do sítio ativo, formando um complexo denominado enzima-substrato. Após essa complementação ocorrem algumas alterações na estrutura da enzima, na qual facilitam as reações químicas, resultando na conversão do substrato em produto. Com a liberação do produto do sítio ativo, a enzima estará disponível para iniciar novas reações (PACHECO & MENDES, 2021).

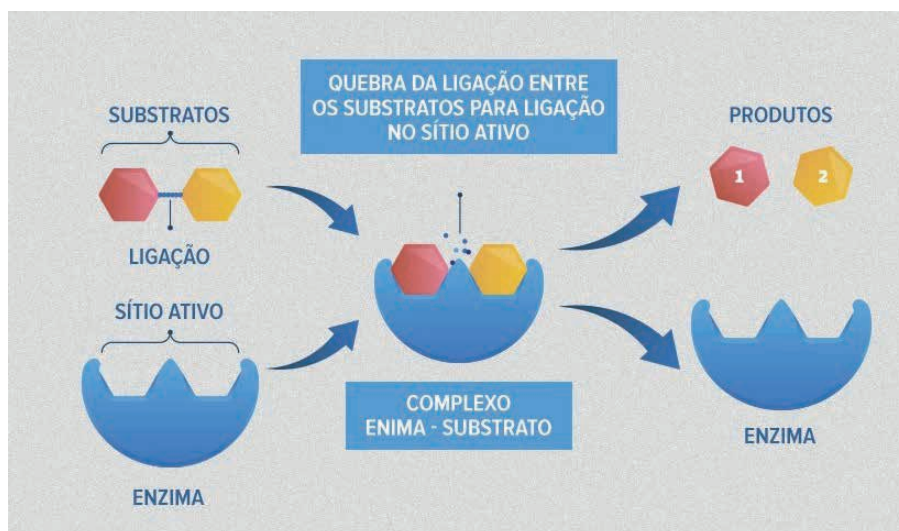


Figura 1 – Mecanismo de ação da enzima

Fonte: TANAKA (2019).

Existem alguns fatores que podem afetar a atividade enzimática, como a temperatura, o pH, a concentração de substrato. A atividade enzimática também pode ser afetada pelas alterações de concentração, conforme a concentração aumenta, aumenta a taxa de reação e os inibidores, a presença deles podem afetar a atividade enzimática, haja vista que podem se ligar de forma reversível ou irreversível as enzimas, afetando a capacidade de catalisar uma reação, ou de se ligar a um substrato. Cada enzima possui características específicas e diferentes fatores podem ter efeitos variados (PACHECO & MENDES, 2021; WEN *et al.*, 2019).

O mecanismo de extração por enzimas é uma técnica amplamente utilizada para

auxiliar no processo de quebra de ligações complexas dos compostos bioativos presentes nos materiais vegetais. As enzimas envolvidas no processo são intituladas de enzimas hidrolíticas ou degradativas, elas possuem a capacidade de quebrar ligações químicas específicas que são encontradas nos vegetais. Cada enzima possui a sua especificidade para cada tipo de ligação química que ela é compatível de quebrar (CHENG *et al.*, 2015).

Tais enzimas possibilitam o aumento da permeabilidade celular, auxiliando no rompimento das ligações químicas da parede celular, tornando-as mais solúveis e consequentemente, favorecendo a extração dos compostos bioativos. Esse processo proporciona uma maior eficiência catalítica, e ao mesmo tempo, preserva a efetividade original dos produtos naturais (CHENG *et al.*, 2015).

Neste contexto, cada técnica enzimática para obtenção de compostos bioativos possui uma metodologia. Uma das tecnologias enzimáticas é a extração assistida por enzimas, que é considerada uma técnica não convencional, e tem sido uma alternativa viável, haja vista a sua seletividade e por ser ambientalmente correta. Durante o processo, as enzimas hidrolíticas rompem as paredes celulares, a rede formada por polissacarídeos, como a hemicelulose, pectina, celulose e lignina, e consequentemente, tornando possível a liberação dos compostos bioativos (PATIL *et al.*, 2021; SONG *et al.*, 2020).

Essa ruptura ocorre com a ligação entre o sítio ativo da enzima que possui maior especificidade e a parede celular, ocasionando a interação, isso ocorre devido a enzima alterar a sua forma possibilitando o encaixe do substrato no sítio ativo. Enquanto acontece a liberação dos compostos, as alterações ocorridas no aspecto da enzima quebram as ligações da parede celular (LEAL *et al.*, 2023).

Segundo MARATHE *et al.* (2019), a parede celular dos vegetais é constituída sobretudo de pectina, hemicelulose e celulose, que são consideradas as principais barreiras para a extração dos bioativos. As metodologias associadas a técnicas enzimáticas são fundamentais, uma vez que, as enzimas degradam esses componentes da parede celular, deste modo, permitindo a liberação dos compostos. Durante esse processo, a interação enzima-substrato é consideravelmente importante, uma vez que essa interatividade irá determinar a extensão da hidrólise dessas barreiras existentes.

APLICAÇÕES DAS ENZIMAS NA ÁREA DO TEMA

O aproveitamento de resíduos da indústria de alimentos, através da inserção de novos processos integrados, permite aliar a produtividade com a eficiência ambiental. As indústrias de alimentos, em especial as processadoras de frutas e hortaliças, geram elevados volumes de subprodutos e resíduos potencialmente ricos em substâncias de alto valor nutricional e funcional. Dentro desse contexto, a utilização de enzimas como pré-tratamento para a extração de substâncias de interesse comercial vêm se destacando na área farmacêutica e alimentícia (KOSSEVA, 2009; ARVANITOYANNIS; VARZAKAS, 2008).

Há na literatura diferentes estudos voltados para aplicações de enzimas em extração de bioativos, como recuperação de bioativos a partir do bagaço de uva, ativo extraído de gengibre por meio de enzimas específicas, bem como a utilização de enzimas para obtenção de óleos essenciais. (CASSINI, 2010; GRUZ *et al*, 2013; SANTOS, 2018)

Como elucidado por QUEIROZ (2012), os compostos bioativos são nutrientes com ação metabólica ou fisiológica específica. Estas substâncias podem ser extraídas de plantas, frutas e vegetais, o que explica o fato da grande maioria das enzimas utilizadas em processos de extração de bioativos serem do grupo das celulasas, responsáveis pela degradação da celulose, principal composto presente nas células vegetais. Na tabela 1 pode se observar quais os grupos de enzimas mais utilizados na área de bioativos e quais compostos foram extraídos.

Compostos bioativos	Enzimas utilizadas	Autores
Antioxidantes na folha e na flor de <i>Feijoa sellowiana</i>	Glicosil-hidrolase	Dacoreggio et al (2018)
Compostos fenólicos e atividade antioxidante na casca de romã.	Celulasas e pectinases	Alexandre et al. (2019)
Antocianinas presentes na espécie <i>Akebia trifoliata</i>	Celulasas e pectinases	Jiang et al. (2020)
Cafeína	Endo-beta-glucanase; xilanase e hemicelulase	Carvalho, Gabriel (2020).
Carotenóides na espécie <i>Portunus segnis</i>	Proteases	Hamdi et al (2020)

Tabela 1: Estudo de enzimas aplicadas em processos de extração de compostos bioativos.

Fonte: Levantamento bibliográfico feito pelos autores (2023).

INOVAÇÃO NO TEMA

As tecnologias são amplamente aplicadas em diferentes segmentos, e podem ser classificadas como tecnologias convencionais e não convencionais ou emergentes. As convencionais, que são aquelas amplamente adotadas devido ao uso confiável, contemplam a extração à base de solventes orgânicos, com possibilidade alternativa de utilização de agitação e aquecimento. As não convencionais ou emergentes são aquelas que prezam pela redução ou não utilização de solventes orgânicos, minimização de gasto de energia e valorizam a preservação ambiental. Além desses fatores, as tecnologias emergentes têm despertado grande interesse das indústrias e comunidade científica, isso porque essas alternativas tecnológicas reduzem a degradação dos compostos bioativos presentes nos vegetais, em virtude de a utilização das temperaturas serem consideravelmente menores, bem como, a redução do tempo de extração (JUSTINO *et al.*, 2022).

A utilização de enzimas para obtenção de compostos bioativos tem se destacado, o que requer novos estudos para enfim estabelecer-se comercialmente. Essas tecnologias

enzimáticas notoriamente possuem estratégias eficazes e com isso tem sido modificadas e praticadas por pesquisadores nos últimos anos. As sugestões de aperfeiçoamento das técnicas reduzem alguns dos desafios que são impostos pela extração convencional. O uso das enzimas possibilita um rendimento superior ao esperado e também, como já mencionado, reduz o tempo de extração. Um ponto promissor de pesquisa é a determinação de interações enzimáticas, bem como a condição de estabilidade durante o processo. Acredita-se que por meio da biotecnologia e métodos modernos, é possível desenvolver novas enzimas com funcionalidades complementares, um grande potencial do futuro, haja vista as inúmeras pesquisas na área (MARATHE *et al.*, 2019).

Essas condições inovadoras referentes ao tema estão diretamente relacionadas às alternativas viáveis, ambientalmente corretas, constantemente associadas a técnicas verdes. Algumas dessas técnicas enzimáticas possuem benefícios como a minimização da periculosidade de síntese química, solventes consideravelmente mais seguros, redução do tempo e de etapas, extrações eficazes, reduz a poluição e utilização de matéria prima renovável. Os estudos voltados para as fontes de compostos bioativos são promissores, e essas técnicas inovadoras proporcionam a extração eficiente atendem aos requisitos almejados (SANTOS & SANTANA, 2022).

DESAFIOS

Com a crescente demanda industrial por aproveitamento de resíduos e subprodutos que possam ser utilizados de forma a contribuir para uma produção econômica e sustentável, Carvalho (2020) relata que novas tecnologias vêm sendo desenvolvidas a fim de potencializar o aproveitamento de compostos de interesse nas indústrias de alimentos, cosméticos e farmacêuticos. Conforme explica Cheng *et al.*, (2015), a extração por enzimas é uma técnica utilizada na quebra das ligações fortes das substâncias que compõem os bioativos que se misturam com proteínas, pectina, amido e celulose na matriz vegetal. As enzimas favorecem a permeabilidade da parede celular; assim, possibilita que os rendimentos de extração de compostos bioativos sejam satisfatórios, podendo remover os componentes desnecessários das paredes celulares, preservando assim a eficácia original dos produtos naturais.

Recentemente, houve um aumento de pesquisas com o uso de enzimas para melhorar o rendimento na obtenção de compostos bioativos, como ácidos graxos insaturados (NGUYEN *et al.*, 2020) e em diversos óleos vegetais (HU *et al.*, 2020; SOUZA *et al.*, 2020). A extração aquosa com uso de enzimas apresenta-se como um processo mais seguro aos manipuladores e à saúde dos consumidores, por não utilizar outros solventes além da água, além de gerar danos mínimos em relação à contaminação do meio ambiente.

Em contrapartida, o processo enzimático apresenta alguns gargalos que necessita de estudos e planejamento, pois é um processo de alto custo, uma vez que é necessária a

produção e purificação das enzimas a serem aplicadas e suas condições devem ser bem delimitadas, uma vez que enzimas são altamente sensíveis e atuam em faixa de temperatura e pH específicos. Outro fator preponderante é a desnaturação enzimática que pode ocorrer devido a temperaturas elevadas, o que pode acarretar também o comprometimento da qualidade e na ação bioativas dos compostos. (CHENG *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2020; DEY *et al.*, 2016).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação de enzimas para extração de bioativos está recebendo grande destaque em dimensão laboratorial, especialmente analisando as vantagens como redução do tempo de extração e melhores rendimentos dos produtos, requerendo o mínimo de solventes. Entretanto, a aplicação de enzimas é um processo de alto custo, uma vez que é necessária a produção e purificação das enzimas a serem aplicadas e suas condições devem ser bem delimitadas, visto que estas substâncias são altamente sensíveis e atuam em faixa de temperatura e pH específicos. Dessa forma, se faz necessário um planejamento prévio para o uso dessa tecnologia aplicada aos bioativos.

REFERÊNCIAS

Carvalho, Gabriel. **Extração aquosa enzimática de compostos bioativos do grão de café verde e torta residual da extração por prensagem mecânica**. Universidade Federal de Lavras Tese (Doutorado) - 2020.

CASSINI, Juliane. **Utilização de enzimas para a obtenção de óleos essenciais e cumarinas da casca de citrus latifolia tanaka**. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2010.

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

CHAGAS, A. A. A.; RIBEIRO-SANTOS, R.; NASCIMENTO, K. O.; SANTANA, R. F.; AZEREDO, D. R. P.; CARLOS, R. A. **Bioactive compounds of interest to the food industry: properties, applications and perspectives for the consumer market**. Research Society and Development, v.9, n. 10, p. e3469108094, 2020. Disponível em: <https://www.rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/8094>. Acesso em: 07 jul. 2023.

CHEN, Y. et al. **Sesame water-soluble proteins fraction contains endopeptidases and exopeptidases with high activity: a natural source for plant proteases**. Food Chemistry, p. 129519, 2021.

CHENG, X.; BI, L.; ZHAO, Z.; CHEN, Y. **Advances in Enzyme Assisted Extraction of Natural Products**. In: 3rd International conference on material, mechanical and manufacturing engineering (IC3ME 2015). Atlantis Press, 2015. p. 371-375. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2991/ic3me-15.2015.72>. Acesso em: 16 jul. 2023.

FAVELA-TORRES E. et al. Pectinases. In: **Enzyme technology**. New Delhi: Asiatech publisher; p. 273–296. 2005

GRUZ, A. P.; SOUZA, C.G.; TORRES, A.G.; FREITAS, S. P. CABRAL, L. M. **RECUPERAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS A PARTIR DO BAGAÇO DE UVA**. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP, v. 35, n. 4, p. 1147-1157, Dezembro 2013

GRUZ, A. P. G.; SOUSA, C. G. S.; TORRES, A. G.; FREITAS, S. P.; CABRAL, L. M. C. **Recuperação de compostos bioativos a partir do bagaço de uva**. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 35, p. 1147-1157, 2013. Disponível em: scielo.br/j/rbf/a/tVS6ZKgCJthm4bsZZDpFyzB/?format=pdf&lang=pt. Acesso em: 05 jul. 2023.

GUAADAOU, A.; BENAICHA, S.; ELMAJDOUB, N.; BELLAOU, M.; HAMAL, A. **What is a bioactive compound? A combined definition for a preliminary consensus**. International Journal of Nutrition and Food Sciences, v. 3, n. 3, p. 174-179, 2014. Disponível em: <https://citeseerx.ist.psu.edu/>. Acesso em: 05 jul. 2023.

HAMDI, M. et al. **Development of novel high-selective extraction approach of carotenoproteins from blue crab (Portunus segnis) shells, contribution to the qualitative analysis of bioactive compounds by HR-ESI-MS**. Food Chemistry, [Kidlington], v. 302, Jan. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31419773/>. Acesso em: 29 jul. 2023.

HU, B. et al. **Oil extraction from tiger nut (Cyperus esculentus L.) using the combination of microwave-ultrasonic assisted aqueous enzymatic method - design, optimization and quality evaluation**. Journal of Chromatography A, [Amsterdam], v. 1627, Sept. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021967320306579>. Acesso em: 22 out. 2023.

JUSTINO, H. D. F. M.; CUNHA, J. S., PACHECO, A. F. C., PACHECO, F. C., MARTINS, C. C. N., PAIVA, P. H. C.; JÚNIOR, B. R. D. C. L. **Uso de tecnologias não convencionais para extração de compostos bioativos de subprodutos de frutas e vegetais: revisão**. Research, Society and Development, v. 11, n. 14, p. e44111435488-e44111435488, 2022. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/35488>. Acesso em: 06 jul. 2023.

KERMASHA, S.; ESKIN, M. N. Enzymes. In: KERMASHA, S.; ESKIN, M. N. **Enzymes Novel Biotechnological Approaches for the Food Industry**. 1 ed. Cambridge: Academic Press, 2021. cap 2, 2021, páginas 15-44.

LARIOS&CRUZ, R.; LONDOÑO-HERNÁNDEZ, L.; GÓMEZ&GARCÍA, R.; GARCÍA-GALINDO, I.; SEPULVEDA, L.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; AGUILAR, C. N. **Extraction of bioactive molecules through fermentation and enzymatic assisted technologies**. High Value Fermentation Products: Human Health, v. 1, p. 27-59, 2019. Disponível em: <https://doi-org.ez6.periodicos.capes.gov.br/10.1002/9781119460053.ch2>. Acesso em: 08 jul. 2023.

LEAL, G. F.; SARAIVA, L.S.; SILVA, R.R.; MACENA, M.A.; OLIVEIRA, J. E.B.; PRADO, G.M. SANTINONI, G. F. D.; LIMA, R. A. F. **Extração assistida por enzimas de compostos bioativos de frutos: uma revisão**. Florianópolis, SC: Instituto Scientia, 2023.

MARATHE, S. J.; JADHAY, S. B.; BANKAR, S. B.; DUBEY, K. K.; SINGHAL, R. S. **Improvements in the extraction of bioactive compounds by enzymes**. Current Opinion in Food Science, v. 25, p. 62-72, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214799318301474>. Acesso em: 07 jul. 2023.

NGUYEN, H. C. et al. **Aqueous enzymatic extraction of polyunsaturated fatty acid-rich *sacha inchi* (*Plukenetia volubilis* L.) seed oil: An eco-friendly approach.** LWT - Food Science and Technology, [Amsterdam], v. 133, Nov. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643820309816>. Acesso em: 12 nov. 2023.

PACHECO, T. F.; MENDES, T. D. **Guia prático para caracterização de enzimas.** Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2021.

PATIL, P. D.; PATIL, S. P.; KELKAR, R. K.; PATIL, N. P.; PISE, P. V.; NADAR, S. S. **Enzyme-assisted supercritical fluid extraction: An integral approach to extract bioactive compounds.** Trends in Food Science and Technology, v. 116, p. 357–369, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224421004775>. Acesso em: 07 jul. 2023.

ROBINSON, P. K. **Enzymes: principles and biotechnological applications.** Essays in biochemistry, v. 59, p. 1, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4692135/>. Acesso em: 05 jul. 2023.

SANTI, L.; BERGER, M.; SILVA, W. **PECTINASES E PECTINA: APLICAÇÃO COMERCIAL E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO.** Caderno pedagógico, Lajeado, v. 11, n. 1, p. 130-139, 2014. ISSN 1983-0882.

SANTOS, T. R. J.; SANTANA, L. C. L. D. A. **Conventional and emerging techniques for extraction of bioactive compounds from fruit waste.** Brazilian Journal of Food Technology, v. 25, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1981-6723.13021>. Acesso em: 18 jul. 2023.

SANTOS, Tailane Caína. **EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE *Zingiber officinale* Roscoe E AVALIAÇÃO DA SUA ATIVIDADE FRENTE A FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Staphylococcus aureus*.** Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Sergipe. Lagarto, 2018.

SONG, Y. R.; HAN, A. R.; PARK, S. G.; CHO, C. W.; RHEE, Y. K.; HONG, H. D. **Effect of enzyme-assisted extraction on the physicochemical properties and bioactive potential of lotus leaf polysaccharides.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 153, p. 169–179, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813019376500>. Acesso em: 12 jul. 2023.

TANAKA, N. **Enzimas.** Todo Estudo, 2019. Disponível em: <https://www.todoestudo.com.br/biologia/enzimas>. Acesso em: 15 jul. 2023.

TIANFEI, D. Application of enzyme technology in food processing and testing. In: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing, p. 052066, 2020. Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1/>. Acesso em: 05 jul. 2023.

WEN, L.; ZHANG, Z.; SUN, D. W.; SIVAGNANAM, S. P.; TIWARI, B. K. **Combination of emerging technologies for the extraction of bioactive compounds.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 60, n.11, p. 1826-1841, 2020. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2019.1602823>. Acesso em: 14 jul. 2023.

ZHANG, J. et al. **Recent advances in the extraction of bioactive compounds with subcritical water: A review.** Trends in Food Science and Technology, [England], v. 95, p. 183-195, Jan. 2020a. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224419303668>. Acesso em: 18 jul. 2023.

DETECÇÃO DE CORONAVÍRUS EM SUPERFÍCIES DE UM CENTRO DE TRIAGEM E DIAGNÓSTICO ATRAVÉS DOS MÉTODOS RT-PCR E ANTÍGENO

Data de aceite: 02/10/2023

Bianca Picinin Gusso

Biomédica. Mestranda em Ambiente e Saude (UNIPAC).

Alexandre Lemos de Souza

Biomédico. Acadêmico do Curso de Medicina da Universidade Alto Vale do Rio do Peixe (UNIARP).

RESUMO: Durante a pandemia do coronavírus que mobilizou o mundo, centros de triagem foram criados nas cidades para que um melhor suporte fosse fornecido a população, oferecendo atendimento médico, realização de exames e fornecimento de alguns medicamentos relacionados ao tratamento do Sars-Cov-2. No entanto, há um grande fluxo de pessoas em circulação no local com suspeita de contaminação pelo vírus, fazendo com que a chance de contágio seja maior. Desta forma, mesmo com a desinfecção realizada, partículas virais podem estar contidas nas superfícies do centro de triagem da cidade de Lages. O objetivo deste trabalho foi identificar a presença de cepas de coronavírus em superfícies do centro de triagem de Lages, SC. Foram usados dois métodos de diagnóstico, sendo um o RT-PCR,

considerado padrão ouro para diagnóstico de COVID-19 e o outro por antígeno, sendo mais convencional, utilizado com frequência devido ser obtido o resultado em menor tempo. As superfícies coletadas foram o oxímetro, cadeira de espera, cadeira de coleta, bebedouro, caneta, estetoscópio, prancheta, suporte de senha, entrada de O2 e visor de equipamento de um paciente internado. Foram diagnosticados a presença de genoma viral em seis das dez amostras das superfícies coletadas, fazendo com que através do método de testagem antígeno todas as amostras obtiveram o resultado negativo e a análise da mesma amostra coletada através do método RT-PCR, fosse encontrado em seis das superfícies a partícula do vírus.

PALAVRAS-CHAVE: Coronavírus; Superfície; Diagnóstico; RT-PCR; Antígeno.

DETECTION OF CORONAVIRUS ON SURFACES IN A SCREENING CENTER AND DIAGNOSIS THROUGH RT-PCR AND ANTIGEN METHODS

ABSTRACT: During the coronavirus pandemic that mobilized the world, screening centers were created in cities so

that better support was provided to the population, offering medical care, exams and supply of some medications related to the treatment of Sars-Cov-2. However, there is a large flow of people circulating in the area suspected of being infected by the virus, making the chance of contagion greater. Thus, even with the disinfection carried out, viral particles may be contained on the surfaces of the screening center in the city of Lages. The objective of this work was to identify the presence of coronavirus strains on surfaces at the screening center in Lages, SC. Two diagnostic methods were used, one being RT-PCR, considered the gold standard for the diagnosis of COVID-19, and the other by antigen, being more conventional, used frequently because the result is obtained in less time. The surfaces collected were the oximeter, waiting chair, collection chair, drinking fountain, pen, stethoscope, clipboard, password holder, O2 input and an inpatient equipment display. The presence of viral genome was diagnosed in six of the ten samples from the surfaces collected, so that, through the antigen testing method, all samples obtained a negative result and the analysis of the same sample collected through the RT-PCR method was found in six from surfaces to the virus particle.

KEYWORDS: Coronavirus; Surface; Diagnosis; RT-PCR; Antigen.

1 | INTRODUÇÃO

No ano de 2002, na China, foram relatados os primeiros casos associados ao coronavírus (Sars-CoV), em que estes causavam infecções respiratórias brandas, semelhantes a um resfriado comum, denominado de SARS (*Severe Acute Respiratory Syndrome*). No ano de 2004, nenhum caso de SARS foi relatado mundialmente, determinando que desde de 2003 esta epidemia global está controlada (BORGES et al., 2020).

Outro coronavírus (MERS-CoV) distinto do que causou a SARS-Cov foi isolado no ano de 2012 na Arábia Saudita primeiramente, que ficou conhecido pela sigla MERS (do inglês *Middle East Respiratory Syndrome*), devido sua propagação para países do Oriente Médio, Europa e África. As manifestações clínicas evoluíram, fazendo com que as doenças respiratórias brandas se tornassem pneumonia, acompanhadas de sintomas como febre, tosse e dispneia (BRASIL, 2014).

A doença COVID-19 (do inglês *coronavirus disease 2019*) surgiu em dezembro de 2019, em Wuhan, na China, com o vírus conhecido como coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2, abreviado para SARS-Cov-2. (BRASIL, 2020). Os casos se agravaram de maneira exponencial e, em 11 de março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a COVID-19 como pandemia (ONYEAKA et al., 2021).

O SARS-Cov-2 é um vírus emergente que possui uma molécula de RNA+, por este motivo, suas bases nitrogenadas são adenina, citosina, guanina e uracila e devido às elevadas taxas de erros da RNA polimerase dependente de RNA, possui uma alta frequência de mutação. No seu genoma possuem nucleotídeos que são compostos por molécula de açúcar (ribose), um ácido fosfórico e uma base nitrogenada. Possui em torno de 29 proteínas virais, sendo que as principais são a glicoproteína de pico (proteína S), que

permite a entrada do vírus na célula hospedeira e nucleocapsídeo viral (proteína N) que regula o processo de replicação viral (UZUNIAN, 2020).

A principal forma de transmissão do vírus se dá através de gotículas disseminadas e de aerossóis, além do contato com superfícies contaminadas. Cerca de 5% da transmissão pode ocorrer através das fezes de pessoas infectadas. Para que a contaminação pelo contato de superfícies ocorra, a pessoa realiza o contato da mão à superfície e posteriormente à boca, ao nariz e aos olhos. Devido ao fato de o vírus sobreviver de horas a dias nesses locais, dependendo da superfície e condições de ambiente e umidade, sugere-se a higienização com água e sabão ou álcool 70% de todas as superfícies, para que uma possível transmissão seja evitada (MICHELIN, SCHRAGE LINS, FALAVIGNA, 2020). Em materiais plásticos e aço inoxidável, por exemplo, o vírus permanece cerca de 3 dias (72h), em papelão 1 dia (24h), em cobre 4h, já em aerossóis e poeiras permanece cerca de 40min a 2h30min. (INCA, 2020).

De acordo com o boletim epidemiológico número 02/2021 referente a Síndrome Respiratória Aguda Grave SRAG em Santa Catarina, a partir dos dados referentes ao período do dia 03/01/2021 até o dia 08/05/2021 foram detectados 25.399 casos pelo Sars-cov-2 no estado. (SANTA CATARINA, 2021). Sendo que desde o início da pandemia, Santa Catarina registrou 909.248 casos de coronavírus, 874.755 destes já estando recuperados e possuindo 20.460 casos ativos no momento. (SANTA CATARINA, 2021)

No município de Lages, de acordo com as informações oficiais divulgadas no boletim oficial do estado de Santa Catarina do dia 08/05/2021, haviam 21668 casos positivados desde o início da pandemia, sendo que 20629 já estavam recuperados e haviam no momento 633 casos ativos no município (SANTA CATARINA, 2021)

O período de vacinação já estava em andamento e foram aplicadas na época 46.697 doses da vacina, entre primeira e segunda dose da população de Lages, Santa Catarina. (SANTA CATARINA, 2021).

A presente pesquisa teve como objetivo identificar a presença de cepas de coronavírus em superfícies do centro de triagem de Lages, Santa Catarina, Brasil.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas 10 amostras coletadas de superfícies do centro de triagem Tito Bianchini em Lages, Santa Catarina. Estas superfícies foram escolhidas a partir da observação aleatória de maior utilização por parte da equipe e dos pacientes circulantes no centro de triagem, sendo que o centro possuía zonas com o qual os pacientes circulavam e zonas restritas aos profissionais de saúde. No momento da coleta, a temperatura do ambiente se encontrava em 20°C.

Foram coletadas de superfícies de cinco ambientes diferentes, sendo o local externo de espera (Zona 1), onde encontravam-se as senhas e a cadeira de espera, a recepção

(Zona 2), onde encontravam-se o bebedouro, a caneta e o oxímetro, o local de consultas (Zona 3) onde encontrava-se o estetoscópio, a sala amarela (Zona 4), onde encontrava-se o equipamento respiratório, a entrada de O₂ de um paciente positivado de COVID-19 e a sala de coleta (Zona 5) onde encontrava-se a prancheta e cadeira de coleta, conforme apresentado na figura 1.



Figura 1. Planta do Centro de Triagem Tito Bianchini, Lages – SC. Fonte: Secretaria de Infraestrutura de Lages

As coletas foram realizadas no período de intervalo das desinfecções realizadas (às 13h), sendo o horário de maior fluxo de pessoas no local, sendo das 12h às 13h os atendimentos médicos paralisados devido ao intervalo de almoço, e assim, acumularia maiores atendimentos para ser realizados. As desinfecções realizadas pelos responsáveis de limpeza eram às 7h da manhã e às 19h da noite, mesmo todos os funcionários sendo instruídos a realizarem a desinfecção de objetos após cada paciente utilizar, devido à sobrecarga de trabalho e grande demanda de atendimento, isso nem sempre foi possível.

As amostras foram coletadas seguindo as especificações do fabricante Bofitech, com um Swab estéril e imediatamente inseridos no *buffer*, com o tampão de extração, composto por cloreto de sódio, azida sódica em tampão Tris-HCl como conservante. Posteriormente levadas para a realização de análise por antígeno, no equipamento IChromall, através no método FIA (Imuno ensaio fluorescente), que conta com a imunodeteção em sanduíche, fazendo com que os antígenos (presentes ou não na amostra) se liguem ao anticorpo presente no tampão, para que caso a amostra seja positiva, gere complexos antígeno-anticorpo. Para a realização do teste é acrescentado 75 μ L do material presente no tubo de extração/*buffer* são adicionados ao cassete, que logo após é inserido no equipamento, que realiza a leitura e apresenta o resultado na tela como “negativo” ou positivo”.

Foi realizada uma avaliação do desempenho clínico do IChroma COVID-19 Ag por parte do fabricante Bofitech, que apresentou uma sensibilidade clínica de 87,5% e uma especificidade clínica de 96,5% em comparação ao teste RT-PCR (BODITECH, 2020).

Para determinação do RT-PCR das amostras, foi utilizada a metodologia descrita por Castineira et. Al, (2021). Foi utilizado um kit comercial de purificação, MaxwellÒ16 ViralTotal Nucleic Acid Purification da Promega, (Madison,USA), seguindo as recomendações do fabricante. Para o diagnóstico, seguiu-se o protocolo do CDC (Center os Disease Control). Brevemente, em um tubo contendo 5ml de amostra, 1,5ml de primers e 0,4ml de Taq, 10ml de Mastermix contendo nucleotídeos, sem água em um volume final de 3ml. As condições de amplificação foram RT incubação 50°C por 30 minutos, 1 ciclo, ativação da enzima a 95°C por 10 minutos, 1 ciclo, amplificação a 95°C por 30 segundos, 58°C por 60 segundos em 45 ciclo.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 10 amostras analisadas, as 10 obtiveram resultado negativo pelo método antígeno (100%) e através do método RT-PCR, 6 positivaram (60%) e quatro negativaram (40%), conforme a Tabela 1.

Amostras Coletadas no Centro de Triagem			
Número da Amostra	Local Coletado	Resultado por Antígeno	Resultado por RT-PCR
1	Bebedouro	Negativo	Negativo
2	Prancheta	Negativo	Positivo
3	Senha	Negativo	Positivo
4	O2	Negativo	Negativo
5	Cadeira Coleta	Negativo	Negativo
6	Cadeira Espera	Negativo	Positivo
7	Aparelho Respiratório	Negativo	Negativo
8	Caneta Recepção	Negativo	Positivo
9	Oxímetro	Negativo	Positivo
10	Estetoscópio	Negativo	Positivo

Tabela 1. Resultados encontrados através de testagens realizadas.

Fonte: Autores.

A zona que maior obteve áreas contaminadas, foi a área externa de espera e a recepção, conforme gráfico 1, devido ser o local com maior fluxo de pessoas e menor desinfecção frequente. Mesmo na sala amarela havendo paciente positivado, todas as

coletas realizadas no local foram negativas, devido as enfermeiras responsáveis realizarem a higienização dos locais toda vez após de manuseados.

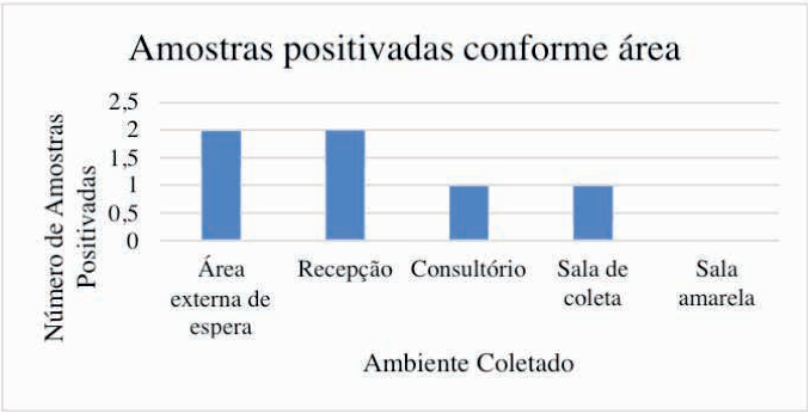


Figura 2. Amostras positivadas conforme área

Fonte: Autores.

Conforme a secretaria de saúde do estado de Mato Grosso do Sul, a de desinfecção recomendada para superfícies de materiais como aço inoxidável e plástico é através do álcool 70%, já para pisos deve ser utilizada a solução de hipoclorito de sódio a 1%, e a limpeza deve ser através de pano úmido, para evitar a dispersão de poeira através da varredura (MATO GROSSO DO SUL, 2020). No centro de triagem onde as amostras deste estudo foram coletadas, as regras de desinfecção seguiam o mesmo critério.

Além da desinfecção das superfícies, a higienização correta e frequente das mãos é de extrema importância, sendo considerada uma das medidas mais eficientes para evitar a transmissão do SARS-Cov-2 (WHO, 2020). Todas as pessoas que circulavam no centro de triagem, eram orientadas pelos profissionais de saúde a realizar a desinfecção correta das mãos, sendo o álcool em gel 70% disponibilizado, porém, nem todas as pessoas seguiam as orientações realizadas, favorecendo a disseminação e consequente propagação de cepas e contaminantes.

Em outra pesquisa realizada por Bloise et al. (2020), foram coletadas 22 amostras de superfícies que eram utilizadas em um laboratório de microbiologia, que a preferência de coleta foi no local onde eram realizados diagnósticos de SARS-Cov-2 durante a pandemia. Dentre essas 22 amostras, quatro positivaram. As duas pesquisas realizaram a testagem através do método considerado padrão ouro (RT-PCR), por identificar partículas do RNA viral em superfícies, comprovando que a transmissão pode ser realizada por este meio, considerando a forma e o intervalo de desinfecção. No centro de triagem, em função da alta demanda, a desinfecção era realizada em períodos diferentes ou que havia possibilidade, sendo que em alguns ambientes com o qual havia maior circulação, a realização da

desinfecção era prejudicada, o que pode ter determinado o alto índice de amostras positivas.

No estudo realizado por SEIF et al. (2021), foram analisadas 76 amostras de superfícies ambientais através da detecção do RNA do vírus. Estas amostras foram obtidas em diferentes enfermarias de um hospital, sendo coletadas antes da desinfecção realizada, onde destas 76 amostras, 40 foram positivas. Em comparação com o estudo realizado neste trabalho, foram coletados em pontos alternados do centro de triagem, concordando com a metodologia acima. Assim, o nosso trabalho revelou que 6 amostras foram positivas, utilizando uma metodologia semelhante.

No momento em que as coletas foram realizadas, a temperatura ambiente era de 20 graus, uma temperatura amena, que não mostrou diminuição de carga viral devido a temperatura, já que o vírus possui persistência diminuída em temperaturas elevadas. Por outro lado, a baixa temperatura juntamente com baixa umidade, favorecem sobrevivência do vírus (TEIXEIRA; CARVALHO, 2020).

Em um estudo realizado referente a estabilidade de aerossóis e superfícies do SARS-Cov-1 em comparação com o SARS-Cov-2, a viabilidade dos dois vírus foi maior em superfícies de aço inoxidável e plástico, em comparação com demais materiais como cobre e papelão (DOREMALEN et al., 2020) Em comparação com o estudo realizado, das seis amostras positivadas, uma era de aço inoxidável, e as outras cinco eram de plástico. Tanto no plástico como no aço inoxidável, em temperaturas ambientes de 20 a 25 graus, o vírus permanece cerca de 3 dias (72h), sendo considerados os dois materiais que o vírus permanece por maior tempo.

O exame através do método RT-PCR é considerado muito sensível e específico, o que minimiza a possibilidade de resultados falsos positivos e/ou negativos, podendo ser obtido resultados fidedignos durante os três estágios da doença, que seria o período de incubação assintomática do vírus (estágio I), onde há maiores chances do vírus não ser detectado, o período sintomático não grave da doença (estágio II), mas já com a presença do vírus, e o período sintomático respiratório grave (estágio III), período onde possui a maior carga viral. Neste estudo realizado, devido ter sido coletado de superfícies ao invés de material biológico, não houve o período de incubação, porém foram identificadas amostras positivas devido este método identificar o RNA (ácido nucleico do vírus) e por isso continua sendo considerado o método padrão ouro para diagnóstico (FIOCRUZ, 2020).

O teste de antígeno assim como os demais testes imunológicos, dependem da reação antígeno-anticorpo, o que pode variar de indivíduo para indivíduo, fazendo com que apesar do teste ser útil principalmente pelo seu tempo curto de realização, não possui a proximidade com o valor real necessário para ser utilizada como triagem de casos de SARS-Cov-2. Desta forma, perante o estudo realizado onde todas as amostras obtiveram resultado negativo através deste método, comprova-se que para coletas de superfície, o mesmo não é eficaz. Já para coletas de material biológico, o método antígeno possui um melhor desempenho perante testes rápidos (imunocromatográficos), porém na fase inicial

da doença apresenta valor preditivo negativo inferior a 50%, confirmando a superioridade do método RT-PCR (SBPC/ML, 2020).

4 | CONCLUSÕES

Estudos comprovam que a transmissão de coronavírus pode ocorrer através de superfícies contaminadas e que a desinfecção correta e com frequência ocasiona a inativação da partícula viral, portanto, as rotinas de desinfecção tanto de higiene pessoal quanto de superfícies, devem ser realizadas com de água e sabão ou álcool 70%, evitando assim a propagação da doença.

O método RT-PCR demonstra-se mais eficaz na detecção de cepas do SARS- Cov-2 perante uma baixa carga viral, devido detectar a presença de seu RNA. Sendo assim, o teste de antígeno não se mostra eficaz perante a baixa carga viral.

A forma de rotatividade de funcionários de equipe multidisciplinar por meio de plantões com cargas horárias extensas perante uma pandemia pode prejudicar o desempenho do profissional de saúde, devido uma sobrecarga, fazendo com que alguns descuidos aconteçam perante a alta demanda e carga horária realizada.

Resultados como esse abrem portas para a possibilidade de realização de um teste semelhante ao antígeno, com sensibilidade igual ao RT-PCR, para que se torne possível a identificação rápida de partícula viral nas superfícies, por meio de um teste que possibilite o resultado em pouco tempo e preço mais acessível para a população e serviços de saúde, para que assim, possam ser monitorados quanto a transmissão em um quadro parecido.

REFERÊNCIAS

BLOISE, I.; GÓMEZ-ARROYO, B. GARCÍA-RODRÍGUEZ, J. Detection of SARS- CoV-2 on high-touch surfaces in a clinical microbiology laboratory. **J. Hosp. Infect.**, v. 105, n. 4, p. 784 – 786, 2020.

BODITECH. Ichroma™ COVID-19 Ag. Disponível em: <<http://www.biosys.com.br/wp-content/uploads/2020/08/BL3692-REV02-07-2020-ICHROMA-COVID-19-AG-1.pdf>>. Acesso em: 15 de mai. de 2021.

BORGES, A. A.; SUZUKAWA, A. A.; ZANLUCA, C.; SANTOS, C. N. D. SARS-CoV-2: origem, estrutura, morfogênese e transmissão. In: BARRAL-NETTO, M.; BARRETO, M. L.; PINTO JUNIOR, E. P.; ARAGÃO, E. (org.). Construção de conhecimento no curso da pandemia de COVID-19: aspectos biomédicos, clínico-assistenciais, epidemiológicos e sociais. Salvador: Edufba, 2020.

BRASIL, Instituto Nacional do Câncer - Encarte Digital. 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/image/tempo-de-duracao- do-virus-em-superficies_0.jpg>. Acesso em: 02 de mai. de 2021.

BRASIL, Ministério da Saúde. Brasília, 2020. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2020/June/02/AcuraciaDiagnostico- COVID19-atualizacaoC.pdf>>. Acesso em: 24 de abr. de 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2014. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/junho/10/Informe-Tecnico-para-Profissionais-da-Saude-sobre-MERS-CoV-09-06-2014.pdf>>. Acesso em: 20 de abr. de 2021.

CASTINEIRAS, T. M. P. P.; NASCIMENTO, E. R. S.; FAFÉ, D. S.; GALLIEZ, R. M.; MARIANI, D.; LEITÃO, I. C.; MELO, M. G. M.; FERREIRA, O. C.; TANURI, A. Performance of an alternative RT-PCR procedure residual sample from the PanbioTMAg COVID-19 test. **Bras. J. Infetct. Dis.**, n. 25, v. 5, p. 1 – 6, 2021.

DOREMALEN, N. V.; MORRIS, DYLAN H.; HOLBROK, GAMBIE, A. WILLIAMSON, B. N.; TAMIN, A.; HARCOURT, J. L.; THORNBURG, N. J.; GERBER,

LLOYD-SMITH, J. O.; WIT, E.; MUNSTER, V. J. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. **N. Engl. J. Med.**, v. 382, n. 16, p. 1564 – 1568, 2020.

ESTADO DE SANTA CATARINA, Secretaria do estado da saúde. Informe Epidemiológico 002/2021 - Síndrome Respiratória Aguda Grave SRAG em Santa Catarina (atualizado em 10/05/2021 – SE 18/2021). 2021a. Disponível em: <<https://www.dive.sc.gov.br/conteudos/boletim2021/SRAG2/Boletim%20Epidemiol%20C3%B3gico%20SRAG%20N%C2%BA2.pdf>>. Acesso em: 20 de mai. de 2021

ESTADO DE SANTA CATARINA. Coronavírus Boletim epidemiológico. 2021b. Disponível em: <<http://www.coronavirus.sc.gov.br/wp-content/uploads/2021/05/boletim-epidemiologico-08-05-2021.pdf>>. Acesso em: 20 de mai. de 2021.

ESTADO DE SANTA CATARINA. Vacinômetro SC. 2021c. Disponível em: <<https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiMG9kNzcxZDAtdmMC00YjUxLWJmODltNmI5N2VIM2JiYzFhliwidCI6ImExN2QwM2ZjLTRIYWMTNGI2OC1iZDY4LWUzOTYzYTJiYzRlNiJ9&pageName=ReportSection>>. Acesso em: 20 de mai. de 2021.

ESTADO DO MATO GROSSO DO SUL. Secretaria do Estado da Saúde. Manual de Condutas para enfrentamento do COVID-19. 2020. Disponível em: <https://www.saude.ms.gov.br/wp-content/uploads/2020/04/Manual-de-Condutas- corrigido-15.04.2020.pdf>. Acesso em: 15 de mai. de 2021.

MICHELIN, L.; LINS, R.S.; FALAVIGNA, A. (org.) COVID-19 Perguntas e respostas. Centro de Telemedicina da UCS. Caxias do Sul: EDUCS, 2020.

ONYEAKA, H.; ANUMUDU, C. K.; AL-SHARIFY, T.; EGELE-GODSWILL, W.; MBAEGBU, P. COVID-19 pandemic: A review of the global lockdown and its far- reaching effects. **Science Progress**, v. 104, n. 2, p. 1 – 18, 2021.

PAVÃO, A. L.; JANOTTI, L.; MOURA, M. L.; GOUVÊA, C.; GRABOIS, V. Considerações sobre o diagnóstico laboratorial da Covid-19 no Brasil. **Observatório Covid-19 FioCruz**, 2020 Nota técnica, 20 p. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/42557/2/Considera%C3%A7%C3%B5esDiagnosticoLaboratorialPandemia.pdf>>. Acesso em: 02 de jul. de 2021.

SEIF, F.; NOORIMOTLAGH, Z.; MIRZAEI, S. A.; KALANTAR, M.; BARATI, B.; FARD, M. E.; FARD, N. K. The SARS-CoV-2 (COVID-19) pandemic in hospital: An insight into environmental surfaces contamination, disinfectants' efficiency, and estimation of plastic waste production. **Environ. Res.**, v. 202, p. 1 – 8, 2021.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA. Métodos Laboratoriais para Diagnóstico da Infecção pelo SARS-CoV-2 - Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial. 2020. Disponível em: <<http://www.sbpc.org.br/wp-content/uploads/2020/04/MetodosLaboratoriaisDiagnosticoSARS-CoV-2.pdf>>. Acesso em: 10 de jul. de 2021.

TEIXEIRA, L.A.; CARVALHO, W.R.G. RS-CoV-2 em superfícies: persistência e medidas preventivas – uma revisão sistemática. **J. Health NPEPS**, v. 5, n. 2, p.1 -16, 2020.

UZUNIAN, A. Coronavírus SARS-CoV-2 e Covid-19. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 56, n. 4, p. e3472020 – e3472020, 2020.

WHO. World Health Organization. Water, sanitation, hygiene, and waste management for the COVID-19 virus. **Unicef**, 2020.

PROGRAMA DE MEDICINA VETERINÁRIA INTEGRATIVA: AVALIAÇÃO DE ÓLEO OZONIZADO NO CONTROLE DE VERMINOSES EM EQUINOS

Data de submissão: 19/08/2023

Data de aceite: 02/10/2023

Ana Luiza Dalava Carone

UENP Universidade Estadual do Norte do
Paraná –Bandeirantes
<http://lattes.cnpq.br/7755539637350285>

Maria Carolina Pansanato José

UENP Universidade Estadual do Norte do
Paraná –Bandeirantes
<http://lattes.cnpq.br/9784320158755613>

Mariza Fordellone Rosa Cruz

UENP Universidade Estadual do Norte do
Paraná –Bandeirantes
<http://lattes.cnpq.br/5308615937693528>

Ana Paula Millet Evangelista dos Santos

UENP Universidade Estadual do Norte do
Paraná –Bandeirantes
<http://lattes.cnpq.br/3766558738366221>

Celmira Calderón

UENP Universidade Estadual do Norte do
Paraná –Bandeirantes
<http://lattes.cnpq.br/1834981382398793>

Júlia Diehl Marcio

UENP Universidade Estadual do Norte do
Paraná –Bandeirantes
<http://lattes.cnpq.br/4999752276345431>

Luciane Holsback Silveira Fertonani

UENP Universidade Estadual do Norte do
Paraná –Bandeirantes
<http://lattes.cnpq.br/0120344533995048>

André Luiz Paulin

UENP Universidade Estadual do Norte do
Paraná – Bandeirantes
<http://lattes.cnpq.br/7097567060373727>

Breno Fernandes

UENP Universidade Estadual do Norte do
Paraná – Bandeirantes
<http://lattes.cnpq.br/1511058440585807>

Matheus de Oliveira Dini Nascimento

UENP Universidade Estadual do Norte do
Paraná – Bandeirantes
<http://lattes.cnpq.br/6453549436144389>

Diego Resende Rodrigues

UENP Universidade Estadual do Norte do
Paraná – Bandeirantes
<http://lattes.cnpq.br/9381400899886153>

Ellen de Souza Marquez

Universidade Estadual do Norte do Paraná
– UENP, Bandeirantes – PR
<http://lattes.cnpq.br/6914421765772272>

RESUMO: O rebanho equino brasileiro é composto aproximadamente de 5,5 milhões de cabeças, sendo o maior da América do Sul, e como a criação desses animais a pasto no país é favorecida pela extensa área de pastagens aliado ao clima tropical,

há maior desenvolvimento, ingestão e infestação de endoparasitas pelos animais, que são responsáveis por diversos prejuízos. O ozônio utilizado funciona como agente terapêutico em um grande número de patologias, representar uma terapia natural e de baixo custo quando comparado a outras drogas antiparasitárias possui poucas contraindicações e efeitos secundários mínimos quando realizado na dosagem certa. Portanto, o objetivo desse trabalho é testar foi avaliar a eficácia do uso do óleo de girassol ozonizado administrado via oral em duas diferentes doses, comparando-se ao uso de vermífugo à base de ivermectina e praziquantel, na redução da contagem de ovos de parasitas gastrointestinais na técnica de OPG em equinos. O estudo envolveu 29 equinos, divididos em 4 grupos para receber diferentes tratamentos, sendo G1- controle, G2- 8 ml óleo de girassol ozonizado Ozo3® (20 microgramas /100 ml), G3- 10 ml óleo de girassol ozonizado Ozo3® (20 microgramas /100 ml), G4- vermífugo (anti-helmíntico Ivermic® equinos tenicida (ivermectina 1% e praziquantel 15%), na dose de 1,6 g/100 kg, e seguido o cronograma: Dia 0: OPG em todos os animais para a divisão dos grupos. Dia 7- Realizados os tratamentos nos animais seguindo o protocolo de cada. Dia 14- Foram repetidos os exames de fezes (OPG) nos animais dos grupos de estudo, e os resultados tabulados e avaliados. O tratamento com vermífugo (ivermectina 1% e praziquantel 15 %), foi mais efetivo na redução da carga parasitária, mas o óleo ozonizado também se mostrou eficaz na redução da carga parasitária, nas duas doses aplicadas, com maior eficácia no G2 (10 ml).

PALAVRAS CHAVE: Óleo ozonizado, OPG, Helmintoses gastro-intestinais

INTEGRATIVE VETERINARY MEDICINE PROGRAM: EVALUATION OF OZONATED OIL IN THE CONTROL OF VERMINOSES IN HORSES

ABSTRACT: The Brazilian equine herd is composed of approximately 5.5 million heads, being the largest in South America, and as the creation of these animals on pasture in the country is favored by the extensive area of pastures combined with the tropical climate, there is greater development, ingestion and infestation of endoparasites by animals, which are responsible for several losses. The ozone used works as a therapeutic agent in a large number of pathologies, representing a natural and low-cost therapy when compared to other antiparasitic drugs has few contraindications and minimal side effects when performed at the right dosage. Therefore, the objective of this work is to test was to evaluate the efficacy of the use of ozonized sunflower oil administered orally in two different doses, compared to the use of dewormer based on ivermectin and praziquantel, in reducing the egg count of gastrointestinal parasites in the OPG technique in horses. The study involved 29 horses, divided into 4 groups to receive different treatments, being G1- control, G2- 8 ml ozonized sunflower oil Ozo3® (20 micrograms /100 ml), G3- 10 ml ozonized sunflower oil Ozo3® (20 micrograms /100 ml), G4- anthelmintic (anthelmintic Ivermic® equine tenicide (ivermectin 1% and praziquantel 15%), at a dose of 1.6 g/100 kg, and followed the schedule: Day 0: OPG in all animals for the division of groups. Day 7- The treatments were performed on the animals following the protocol for each. Day 14- Feces examinations (OPG) were repeated in the animals of the study groups, and the results tabulated and evaluated. The treatment with vermifuge (ivermectin 1% and praziquantel 15%), was more effective in reducing the parasite load, but the ozonized oil was also effective in reducing the parasite load, in the two doses applied, with greater effectiveness in G2 (10 ml).

KEYWORDS: Ozonized oil, EPG, Gastro-intestinal helminthiasis

1 | INTRODUÇÃO

Segundo a FAO e o IBGE o rebanho equino brasileiro é composto aproximadamente de 5,5 milhões de cabeças, sendo o maior da América do Sul e movimenta bilhões ao ano, e como a criação desses animais a pasto no país é favorecida pela extensa área de pastagens aliado ao clima tropical, há maior desenvolvimento, ingestão e infestação de endoparasitas pelos animais (MOLENTO, 2005).

Esses parasitas estão presentes em praticamente todo território nacional e são responsáveis por diversos prejuízos como: espoliação do sistema digestório, redução de peso, menor desenvolvimento, queda de imunidade, maior predisposição a outras doenças e parasitas, entre outros (COSTA, 2011).

O ozônio utilizado funciona como agente terapêutico em um grande número de patologias, representa uma terapia natural e de baixo custo quando comparado a outras drogas antiparasitárias possui poucas contraindicações e efeitos secundários mínimos quando realizado na dosagem certa. (BOCCI, 2000; SOUZA, 2010) Além de ser um poderoso agente oxidante, age na destruição de vírus, bactérias, protozoários e outros parasitas, agindo nos constituintes da membrana citoplasmática, nos sistemas enzimáticos e nos ácidos nucleicos dos microrganismos. (GONÇALVES, 2003).

A propriedade antimicrobiana do ozônio é reconhecida desde a década de 1890, quando foi observada sua capacidade de destruir bactérias durante o tratamento de efluentes na Europa (Foundation. et al., 1991), desde então, a atuação do ozônio contra diversos agentes microbianos vem sendo estudada até hoje, desde bactérias, fungos e vírus, protozoários e parasitos de importância em saúde humana e animal, diversificando o uso do ozônio. (PANDISELVAM et al., 2018).

Na clínica veterinária, a ozonioterapia é utilizada com significativa eficiência no tratamento de diversas enfermidades, o aumento da imunidade e ação antioxidante no organismo, atuando em diversos agravos nos animais (BOCCI, 2009, 2011; CARDOSO, 2009).

O objetivo do presente estudo, foi avaliar a eficácia do uso do óleo de girassol ozonizado administrado via oral em duas diferentes doses (8 e 10 ml), comparando-se ao uso de vermífugo à base de ivermectina e praziquantel, na redução da contagem de ovos de parasitas gastrointestinais na técnica de OPG em equinos.

2 | METODOLOGIA

O experimento foi realizado em Marília- SP e Sorocaba-SP, durante os meses de março a maio de 2022. As análises parasitológicas foram realizadas no Laboratório

de Parasitologia e Doenças parasitárias do Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Estadual do Norte do Paraná-Campus CLM localizado em Bandeirantes- PR.



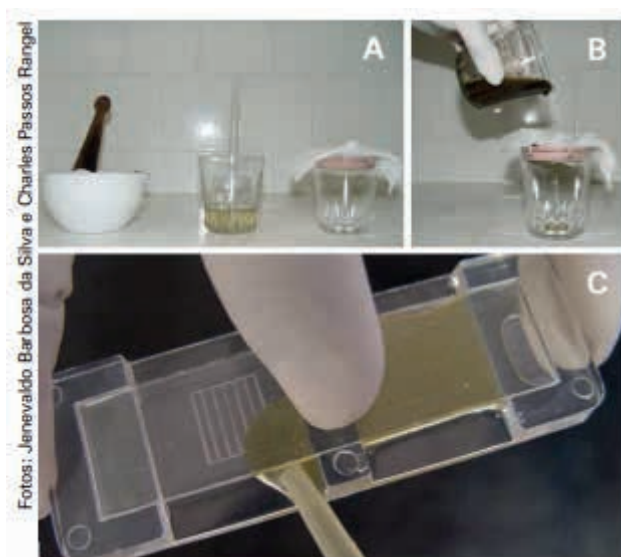
Imagem 1 e 2 – rebanho de equinos da cidade de Marília – SP.

Participaram do estudo 29 equinos, de 2 centros de treinamento para 3 tambores, com diferentes faixas etárias, sendo machos e fêmeas atletas, com alimentação a pasto complementada com ração, e que não tiveram o uso de anti-helmínticos no último ano antes do início do experimento.

Foi coletada então a primeira amostra de fezes, e realizado o exame parasitológico (OPG) para avaliar o estado geral dos animais. As amostras de fezes foram coletadas dos animais diretamente da ampola retal, identificadas em sacos plásticos, conservada em caixa de isopor com gelo até a chegada ao laboratório, onde foi realizado o exame parasitológico através dos métodos de OPG e OoPG, utilizando-se a câmara de McMaster, para a contagem/ identificação dos ovos de parasitas. Após a realização do OPG, verificou-se que os animais se encontravam infectados por parasitas gastro-intestinais.



Imagem 3 e 4 – coleta de fezes realizada em tronco de contenção.



https://orgprints.org/id/eprint/24951/1/Silva,%20J.%20B.,%20Rangel,%20C.P._Monitoramento%20das%20helmintoses%20gastrintestinais%20em%20rebanho%20leiteiro.pdf

Imagem 5 – Demonstração da Técnica de OPG (A) maceração das fezes; (B) filtração; (C) preenchimento da câmara de MacMaster com auxílio de pipeta.

Os animais foram então divididos aleatoriamente em 4 grupos, para a realização dos tratamentos, incluindo todas categorias, sendo 7 animais nos grupos 1,2 e 4, e 8 animais no

grupo 3. Tratamentos: Grupo 1 (G1): controle (sem tratamento), Grupo 2 (G2): 8 ml óleo de girassol ozonizado Ozo3® (20 microgramas /100 ml), Grupo 3 (G3): 10 ml óleo de girassol ozonizado Ozo3® (20 microgramas /100 ml), Grupo 4 (G4): vermífugo (anti-helmíntico Ivermic® equinos tenicida (ivermectina 1% e praziquantel 15%), na dose de 1,6 g/100 kg.

Cronograma realizado: Dia 0 - Realizado o exame de OPG em todos os animais (29 animais) para a divisão dos grupos. Dia 7- Realizados os tratamentos nos animais seguindo o protocolo de cada grupo (G1, G2, G3 e G4). Dia 14- Foram repetidos os exames de fezes (OPG) nos animais dos grupos de estudo, e os resultados tabulados e avaliados.



Imagem 6 e 7 – Administração de vermífugo de óleo de girassol ozonizado via oral.

Os resultados foram tabulados no software Microsoft Office Excel 365. Para análise de variância, foi utilizado o programa ANOVA, seguido de um teste a posteriori de Tukey, após confirmar que os dados apresentavam normalidade.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi possível observar (figura 1), que houve redução na média da quantidade de ovos encontrada na contagem por OPG, nos grupos 2, 3 e 4, comparando-se antes e após dos tratamentos aplicados, no grupo controle (sem tratamento) houve um aumento na contagem do OPG. Observou-se uma diminuição mais acentuada no grupo que recebeu vermífugo (G4), ambos os grupos (G2 e G3) que receberam óleo ozonizado tiveram diminuição na contagem de OPG, mas a média do G2 (10 ml) apresentou resultados melhores, com uma redução maior na contagem de OPG que o G3 (8 ml).

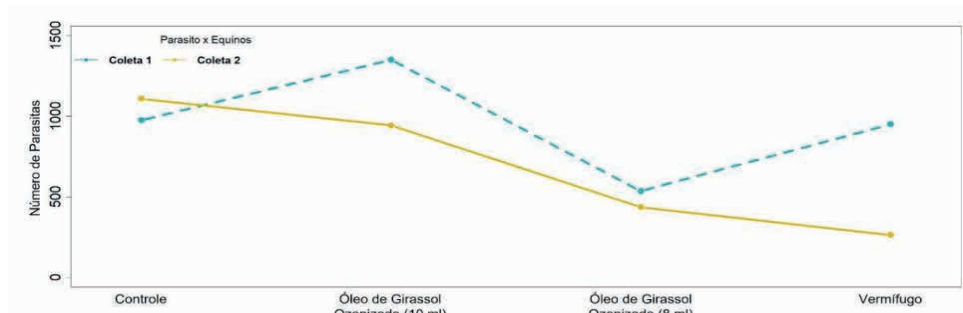


Gráfico 1- Média do número de parasitas por grupo antes e depois do protocolo

De acordo com Molento (2005), a última década demonstrou uma redução na efetividade em drogas antiparasitárias, se tornando um sério problema devido à resistência parasitária, que seleciona indivíduos resistentes, e elimina a população mais suscetível por fator de pressão seletivo dos componentes anti-helmínticos, justificando a necessidade de encontrar alternativas para a resistência como o óleo de girassol ozonizado via oral, que se torna uma possibilidade de baixo custo e fácil manejo, a aplicação oral foi realizada no presente estudo, de forma a facilitar o manejo e aplicação.

O ozônio pode atuar contra os parasitas apresentando efeito oxidante na membrana de revestimento dos ovos de helmintos, promovendo hidrólise de proteínas presentes na membrana dos ovos de helmintos, promovendo a ruptura e evitando a eclosão dos ovos dos parasitas em até 90 %, o que torna o óleo promissor no controle de parasitas (VELÁSQUES et al., 2004).

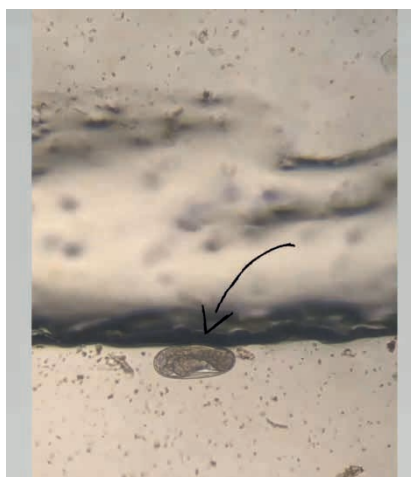
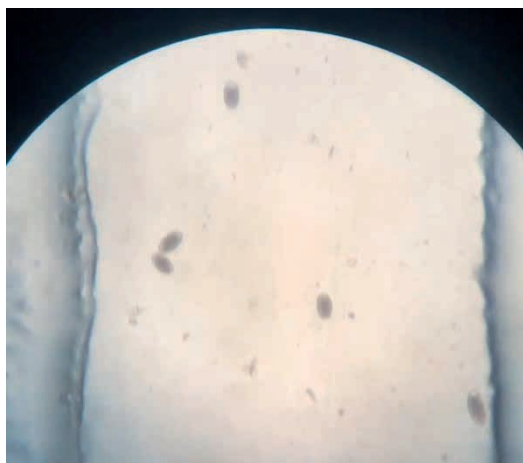


Imagem 8 e 9 – ovos de helmintos encontrados nas fezes dos animais.

Um estudo realizado por Souza, et al (2010), verificou a eficácia da utilização de ozônio via retal como alternativa de tratamento helmíntico.

No presente estudo também foram verificadas diminuições das quantidades de ovos de parasitas nas fezes, nas dosagens de 8 ml (0,01ml/kg), sendo que na dosagem de 10 ml (0,02 ml/kg) teve maior eficácia com redução na quantidade de ovos de 1500 para 1000 ovos por grama, na dosagem de 10 ml (0,02 ml/kg em média) (figura 1).

O tratamento com vermífugo (ivermectina 1% e praziquantel 15 %), foi mais efetivo na redução da carga parasitária, mas o óleo ozonizado também se mostrou eficaz na redução da carga parasitária, nas duas doses aplicadas, com maior eficácia no G2 (10 ml).

4 | CONCLUSÕES

Embora tenha proporcionado uma menor diminuição na contagem de OPG (carga parasitária) que o vermífugo à base de ivermectina e praziquantel, o óleo ozonizado, demonstrou uma boa efetividade, e pode ser promissor no controle de parasitas.

Os resultados demonstram que seriam necessários mais estudos sobre os efeitos do óleo ozonizado, e novas doses devem ser testadas, para verificar sua eficácia, para que se torne uma alternativa viável para o controle de parasitas gastro-intestinais em equinos.

REFERÊNCIAS

BOCCI, V. Ossigeno Ozonoterapia. Comprensione dei meccanismi di azione terapeutiche. Milano: Casa editrice Ambrosiana. 2000. 324 p.

BOCCI, Velio et al. The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. Wiley Interscience, Siena, p.646-682, 3 mar. 2009.

BOCCI, Velio. Ozone. A new medical drug. 2. ed. Siena: Springer, 2011. 132 p.

CARDOSO, Ricardo França. Avaliação do perfil antimicrobiano do gás ozônio. International Ozone Association, São Paulo, 2009.

CHANG, H.Y.; SHELDON, B.W. Application of ozone with physical wastewater treatments to recondition poultry process waters. Poultry science, v.68, p. 1078- 1087, 1989.

COSTA, R. B. Caracterização do parasitismo gastrointestinal em cavalos de desporto e lazer no distrito de Coimbra. 108 f. Mestrado em Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária. 2011.

FOUNDATION., A. R., Langlais, B., Reckhow, D. A. & Brink, D. R. (1991). Ozone in Water Treatment: Application and Engineering (1st Edition ed.). Paris, França: Lewis Publishers.

GONÇALVES, R. F. Desinfecção de efluentes sanitários. Abes, 2003. p. 171 – 190, 2003.

MOLENTO, M.B. Resistência parasitária em helmintos de eqüídeos e propostas de manejo. Ciência Rural, v.35, n.6, p.1469-1477, 2005.

SOUZA, T.I.M. et al. Ação da mistura oxigênio-ozônio sobre parasitas intestinais de ovinos e caprinos. PUBVET, Londrina, V. 4, N. 29, Ed. 134, Art. 910, 2010.

PANDISELVAM, R. et al. Ozone: An Advanced Oxidation Technology for Starch Modification. Ozone: Science & Engineering, v. 41, n. 6, p. 491– 507, 2 nov. 2019.

VELÁSQUEZ, M. T. O., Martínez, J. L., Monje–Ramírez, I. & RojasValencia, M. N. (2004). Destruction of Helminth (*Ascaris suum*) Eggs by Ozone. Ozone: Science and Engineering, 26359–26366

EFEITO DO USO DE ÓLEO OZONIZADO ORAL EM SUÍNOS NO CONTROLE DE PARASITAS GASTROINTESTINAIS

Data de submissão: 19/08/2023

Data de aceite: 02/10/2023

Júlia Diehl Marcio

Universidade Estadual do Norte do Paraná
– UENP, Bandeirantes – PR
<http://lattes.cnpq.br/4999752276345431>

Mariza Fordellone Rosa Cruz

Universidade Estadual do Norte do Paraná
– UENP, Bandeirantes – PR
<http://lattes.cnpq.br/5308615937693528>

Camila Simpionato Pavin

Universidade Estadual do Norte do Paraná
– UENP, Bandeirantes – PR
<http://lattes.cnpq.br/7359222503325998>

Matheus da Silva Negrelli

Universidade Estadual do Norte do Paraná
– UENP, Bandeirantes – PR
<http://lattes.cnpq.br/2711321035920693>

Ana Luiza Dalava Carone

Universidade Estadual do Norte do Paraná
– UENP, Bandeirantes – PR
<http://lattes.cnpq.br/7755539637350285>

Maria Carolina Pansanato José

Universidade Estadual do Norte do Paraná
– UENP, Bandeirantes – PR
<http://lattes.cnpq.br/9784320158755613>

Diego Resende Rodrigues

Universidade Estadual do Norte do Paraná
– UENP, Bandeirantes – PR
<http://lattes.cnpq.br/9381400899886153>

Luciane Holsback Silveira Fertonani

Universidade Estadual do Norte do Paraná
– UENP, Bandeirantes – PR
<http://lattes.cnpq.br/0120344533995048>

Ana Paula Millet Evangelista dos Santos

Universidade Estadual do Norte do Paraná
– UENP, Bandeirantes – PR
<http://lattes.cnpq.br/3766558738366221>

Celmira Calderón

Universidade Estadual do Norte do Paraná
– UENP, Bandeirantes – PR
<http://lattes.cnpq.br/1834981382398793>

Ellen de Souza Marquez

Universidade Estadual do Norte do Paraná
– UENP, Bandeirantes – PR
<http://lattes.cnpq.br/6914421765772272>

Flávia Debiagi

Universidade Estadual do Norte do Paraná
– UENP, Bandeirantes – PR
<http://lattes.cnpq.br/1743105190261738>

RESUMO: A suinocultura no Brasil tem grande importância no cenário mundial, sendo o sistema intensivo a principal forma de criação de suínos no país. Contudo, há também os sistemas de criação semi-intensivo e extensivo e, devido ao contato

dos suínos com a terra, aliado ao clima tropical do país, os desafios relacionados ao controle de parasitas gastrointestinais são maiores. Dessa forma, esse trabalho visa avaliar a eficácia do óleo de girassol ozonizado oral como tratamento para redução desses parasitas em suínos, comparando-o com um vermífugo convencional, visto que a ozonioterapia é eficaz para tratar diversas patologias, incluindo infecções parasitárias. A pesquisa foi realizada em quatro propriedades produtoras de suínos, coletando fezes de 93 animais para análise parasitológica. Entretanto, apenas uma das propriedades apresentou suínos com carga parasitária considerável permitindo a realização da pesquisa. Os suínos foram divididos em grupos com diferentes tratamentos, incluindo controle, óleo ozonizado, vermífugo e uma combinação de ambos. A pesquisa envolveu a coleta de fezes em diferentes momentos e a análise estatística dos resultados. Os grupos tratados com óleo ozonizado e o vermífugo apresentaram reduções significativas na carga parasitária, especialmente quando combinados, desse modo, os resultados obtidos evidenciam a eficácia do óleo ozonizado no controle de parasitas gastrointestinais em suínos. No entanto, mais estudos são necessários para determinar as doses e os intervalos de aplicação ideais para obter melhores resultados.

PALAVRAS-CHAVE: Ozonioterapia, helmintos, OPG.

EFFECT OF THE USE OF ORAL OZONIZED OIL IN SWINE ON THE CONTROL OF GASTROINTESTINAL PARASITES

ABSTRACT: The swine farming industry in Brazil holds significant global importance, with intensive farming being the primary method of swine production in the country. However, there are also semi-intensive and extensive farming systems, and due to swine's contact with the soil combined with the country's tropical climate, challenges related to gastrointestinal parasite control are greater. Thus, this study aims to assess the efficacy of orally administered ozonized sunflower oil as a treatment for reducing these parasites in swines, comparing it with a conventional dewormer, given that ozone therapy is effective in treating various pathologies, including parasitic infections. The research was conducted on four swine-producing properties, collecting feces from 93 animals for parasitological analysis. However, only one of the properties had swines with a considerable parasitic load, allowing the research to proceed. The swines were divided into groups with different treatments, including control, ozonized oil, dewormer, and a combination of both. The research involved feces collection at different time points and statistical analysis of the results. The groups treated with ozonized oil and the dewormer showed significant reductions in parasitic load, especially when combined. Thus, the obtained results highlight the efficacy of ozonized oil in controlling gastrointestinal parasites in swines. However, further studies are necessary to determine the ideal dosages and application intervals to achieve better results.

KEYWORDS: Ozone therapy, helminths, EPG.

1 | INTRODUÇÃO

A suinocultura no Brasil tem grande importância no cenário mundial, sendo o 4º maior produtor e o 4º maior exportador de carne suína (ABPA, 2020).

Devido ao grande volume de carne necessário para suprir o mercado global,

a criação intensiva é predominante, esse sistema visa a maior produção possível, garantindo alimentação balanceada, higiene e vacinas e deve-se sempre pensar e levar em consideração o bem-estar animal (SILVEIRA, 2016).

Dessa forma, embora também ocorram problemas no controle de parasitas na criação intensiva, nesse sistema os suínos encontram-se restritos em granjas e não tem contato direto com a terra (SILVEIRA, 2016).

Sendo assim, se no sistema intensivo houver uma adequada limpeza e desinfecção das instalações, um bom manejo de maneira geral, além do controle de roedores e telas impedindo a entrada de aves, é muito mais fácil de se estabelecer um controle dos helmintos, fazendo com que não tenham grande expressividade e não tragam muitos prejuízos a esses animais (EMBRAPA, 2003).

No sistema de criação extensivo ou semi-intensivo, devido ao contato dos suínos com a terra, aliado ao clima tropical do país, há maiores chances de desenvolvimento, ingestão e infestação de endoparasitas pelos animais (SEBRAE, 2014).

Os parasitas gastrointestinais causam danos ao sistema digestório, provocam a redução de peso, um menor desenvolvimento, a queda de imunidade e uma maior predisposição a outras doenças e parasitas, sendo necessário um controle e tratamento com antiparasitários constante (MACHADO et al, 2022).

A ozonioterapia se mostra eficiente no tratamento de diversas patologias de origem inflamatória, infecciosa e isquêmica. A administração intra-retal de ozônio em cães portadores de leishmaniose promove melhora significativa da função renal (MODA et al., 2014).

Resultado semelhante é observado em cães com erliquiose, que receberam a auto-hemoterapia com ozônio, havendo ainda uma resposta positiva sobre os parâmetros hematológicos (GARCIA et al., 2010).

A ozonioterapia se mostrou eficiente como cicatrizante e antisséptico local no tratamento de feridas de pele, neoplasias, processos inflamatórios crônicos, como úlceras e inflamações intestinais, problemas circulatórios e doenças causadas por vírus, como hepatite e herpes (BOCCI, 2011).

Observa-se que a ozonioterapia, além de contribuir na melhora da imunidade, tem ação antioxidante no organismo, possui um baixo custo, poucas contraindicações e efeitos colaterais mínimos quando administrada na dosagem correta (SOUZA, 2010).

O ozônio tem a capacidade de causar estresse oxidativo momentâneo, que produz espécies reativas de oxigênio e produtos lipídicos oxidantes. Essas moléculas são responsáveis por estimular a angiogênese, neovascularização, inibição de apoptose, aumento de citocinas pró-inflamatórias, alteração dos processos metabólicos e ativação do fator nuclear KB (FNKB) (BOCCI, 2011).

Além de destruir vírus, bactérias, protozoários e outros parasitas, agindo nos constituintes da membrana citoplasmática, nos sistemas enzimáticos e nos ácidos nucleicos

dos microrganismos. (GONÇALVES, 2003).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência do óleo de girassol ozonizado oral na redução dos parasitas gastrointestinais em suínos, além de avaliar outros benefícios que podem ser trazidos aos animais.

2 | METODOLOGIA

Foram selecionadas quatro propriedades produtoras de suínos, para que pudesse ser realizada a pesquisa, durante os meses de junho a setembro de 2022. Das propriedades, três eram no norte do Paraná (Bandeirantes – PR) e uma no interior de São Paulo (Piracicaba – SP), sendo três delas de sistema intensivo e uma de semi-intensivo.

Foram coletadas fezes de 93 animais, referentes à 10% do total dos animais presentes nas quatro propriedades, de acordo com Roepstorff; Nansen et al.1998. Foi realizado o teste de OPG (contagem de ovos por grama de fezes) para avaliação da carga parasitária.

Os animais apresentavam diferentes faixas etárias e diferentes tipos de alimentação, sendo os suínos do sistema intensivo alimentados por ração (balanceada conforme a necessidade nutricional) e os do sistema semi-intensivo alimentados com ração, com acesso a pasto, alimentos de origem vegetal (verduras, legumes) e soro de leite.

Os animais não haviam recebido tratamento antiparasitário no último ano antes do início do experimento. A primeira amostra de fezes foi coletada e foi realizado o exame parasitológico OPG (ovos por grama de fezes) e OOPG (oocistos por grama de fezes) para avaliar o estado geral dos animais.

Os materiais (fezes) coletadas foram analisados no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias do Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Estadual do Norte do Paraná – Campus Luiz Meneghel, localizado em Bandeirantes – PR.

Somente foram encontrados parasitas em quantidade suficiente para que pudessem ser testados os tratamentos na propriedade de regime semi-intensivo (figuras 1 e 2), com acesso a pasto, em Bandeirantes, que foi a propriedade escolhida para desenvolvimento da pesquisa.

Foi realizada a primeira coleta de amostras de fezes para processar o exame de OPG e OOPG dos parasitas antes da realização dos tratamentos, para auxiliar na distribuição dos animais nos grupos.

Para a realização da pesquisa, na fazenda escolhida, os animais foram divididos em grupos e distribuídos de forma homogênea: animais adultos e jovens, machos e fêmeas, com diferentes cargas parasitárias, de forma a homogeneizar os grupos experimentais.

Os animais foram divididos em 4 grupos com os seguintes tratamentos:

- Grupo 1 (7 animais): Controle (sem nenhum tratamento);
- Grupo 2 (7 animais): Óleo de girassol Ozonizado (0,22mL/kg para animais adul-

tos e 0,11mL/kg para leitões);

- Grupo 3 (8 animais): Vermífugo Ripercol ® L (Cloridrato de Levamisol 7,5%) – (1mL/20kg de peso vivo);
- Grupo 4 (8 animais): Óleo Ozonizado (0,22mL/kg para animais adultos e 0,11mL/kg para leitões) e Vermífugo – Ripercol ® L (Cloridrato de Levamisol 7,5%) – (1mL/20kg de peso vivo) associados.

Tratamentos realizados:

Tratamento 1 - Após a divisão dos grupos, foi realizada a coleta de fezes antes do primeiro tratamento ser aplicado nos quatro grupos. Passado um intervalo de 15 dias foi realizada a segunda coleta das fezes de todos os grupos, realizando a contagem OPG e OOPG (contagem de ovos e oocistos) dos parasitas gastrointestinais dos suínos amostrados utilizando a câmara de McMaster para contagem e identificação dos ovos de parasitas.

Tratamento 2 - Após 30 dias os procedimentos foram repetidos, foi realizada a primeira coleta de fezes antes dos tratamentos nos quatro grupos e realizada a segunda coleta de fezes após 7 dias dos tratamentos para realização de contagem de OPG e OOPG.

Os resultados foram tabulados no software Microsoft Office Excel 365. Uma análise de variância, ANOVA, foi utilizada seguido de um teste a posteriori de Tukey, após certificação que os dados apresentavam normalidade.



Figura 1 – Criação semi-intensiva de suínos

Fonte: MARCIO, Júlia Diehl (2022).



Figura 2 – Suínos em criação semi-intensiva em contato direto com ave

Fonte: MARCIO, Júlia Diehl (2022).



Figura 3 – Coleta em suíno

Fonte: MARCIO, Júlia Diehl (2022).



Figura 4 – Coleta em suíno

Fonte: MARCIO, Júlia Diehl (2022).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quatro propriedades foram visitadas, considerando que um maior número de animais poderia gerar um resultado mais significativo, mas apenas uma delas, a que apresentava regime semi-intensivo, apresentou indivíduos parasitados, permitindo, então, a realização da pesquisa.

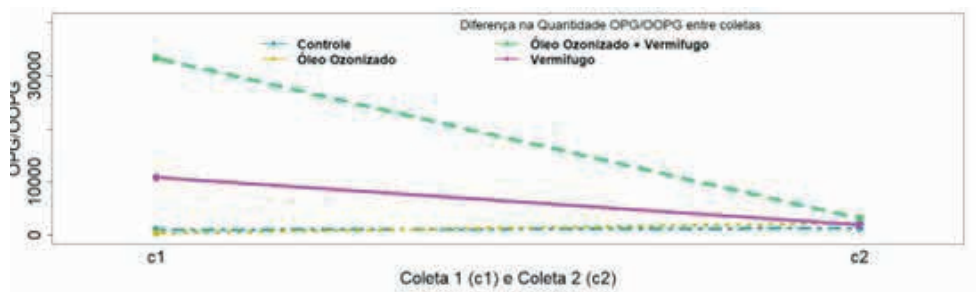


Figura 5 – Gráfico do Tratamento 1 - Diferenças das médias de OPG/OOPG para os grupos de tratamento, evidenciando a evolução entre coletas do Tratamento 1 (coleta 1 antes dos tratamentos, coleta 2 após os tratamentos)

Fonte: MARCIO, Júlia Diehl (2022).

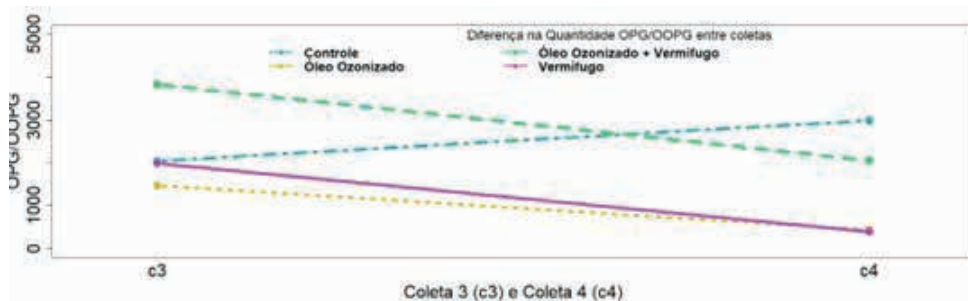


Figura 6 – Gráfico do Tratamento 2 - Diferenças das médias de OPG/OOPG para os grupos de tratamento, evidenciando a evolução entre coletas do Tratamento 2 (coleta 3 antes dos tratamentos, coleta 4 após os tratamentos)

Fonte: MARCIO, Júlia Diehl (2022).

No tratamento 1, houve um intervalo de 15 dias, e não de 7 dias como estava previsto, devido às condições climáticas desfavoráveis com muitas chuvas, o que dificultava no manejo destes animais do sistema semi-intensivo.

O grupo G1 (controle), manteve uma média parasitária constante, uma vez que os animais não receberam nenhum tratamento. Nos grupos G3 e G4 houve queda nas médias parasitárias, evidenciando o potencial do vermífugo nesta redução e, com a administração do vermífugo e óleo ozonizado associados, a redução foi ainda mais evidente, indicando um sinergismo entre eles.

No grupo G2 (óleo ozonizado) do tratamento 1, o crescimento da média parasitária da coleta inicial para final poderia ser justificado pelo intervalo do tratamento prolongado de 2 semanas entre as aplicações (provocado pelas condições climáticas desfavoráveis), no qual a ação do óleo ozonizado não se mostrou eficiente no controle parasitário, inferindo que se fosse testado um intervalo menor entre os tratamentos, a ação do óleo ozonizado poderia ter maior eficiência.

No tratamento 2, no grupo G1 (controle), houve aumento da carga parasitária, que também poderia ser esperado, já que não houve tratamento. No grupo G2 (óleo ozonizado), com o intervalo de uma semana, mostrou-se eficiente, inferindo-se que com intervalo semanal o óleo conseguiu reduzir a carga parasitária. Nos grupos G3 e G4 houve queda proporcional nas médias parasitárias: tanto no G3 (vermífugo) considerando que a concentração plasmática do vermífugo ainda se mantinha, quanto no G4 (vermífugo + óleo ozonizado), em que a redução da carga foi proporcional a G3.

Os principais parasitas encontrados nas fezes dos suínos foram: oocistos de *Coccídeo* - 48,95% (figura 7) e ovos do tipo *Estrongilídeo* - 29,37% (figura 8), totalizando cerca de 78% dos parasitas encontrados. Os demais foram: ovos de *Strongyloides ransomi* - 10,49% (figura 9), ovos de *Trichuris suis* - 9,79% (figura 10) e ovos de *Ascaris suum* - 1,4% (figura 11).

Parasita	N	%
Oocistos de Coccídeo	70	48,95
Ovos do tipo Estrongilídeo	42	29,37
<i>Strongyloides ransomi</i>	15	10,49
<i>Trichuris suis</i>	14	9,79
<i>Ascaris suum</i>	2	1,40

Tabela 1 – Principais parasitas encontrados

Fonte: MARCIO, Júlia Diehl (2022).

O efeito esperado à ação do óleo ozonizado, seria a diminuição da carga parasitária, pois o óleo + O₃ produz efeito oxidante na membrana de revestimento dos ovos de helmintos, o que causaria a hidrólise de proteínas presentes na membrana dos ovos e, consequentemente, iria promover a sua ruptura. Além de ser eficiente em impedir a eclosão dos ovos em até 90%, o óleo ozonizado pode ser promissor no controle de parasitas, como foi observado no trabalho de Velásques et al (2004).

Então, pode-se inferir que o tratamento com ozonioterapia, através da aplicação oral dos óleos ozonizados, com doses maiores às testadas nesta pesquisa e com menores intervalos de aplicação, poderia atuar com mais eficiência no controle de parasitas gastrointestinais.



Figura 7 – Oocistos de Coccídeos

Fonte: MARCIO, (2022).



Figura 8 – Ovos do tipo Estrongilídeo

Fonte: MARCIO, (2022).



Figura 9 – Ovo de *Strongyloides ransomi*

Fonte: MARCIO, (2022).



Figura 10 – Ovo de *Trichuris suis*

Fonte: MARCIO, (2022).

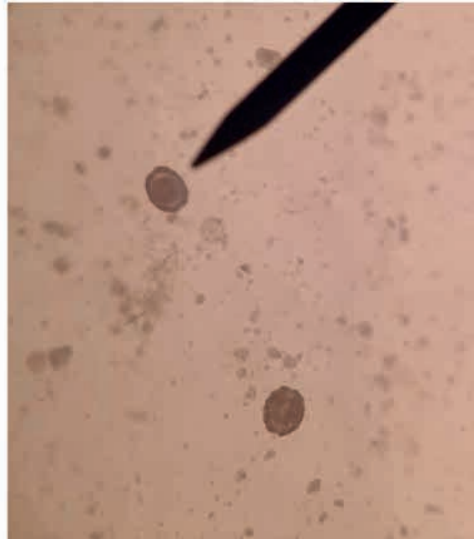


Figura 11 – Ovos de *Ascaris suum*

Fonte: MARCIO, (2022).

4 | CONCLUSÕES

Embora a quantidade de animais amostrados seja relativamente pequena, foi possível a obtenção de resultados promissores.

Dessa forma, pode-se concluir que o óleo ozonizado teve eficácia no controle de parasitas gastrointestinais em suínos, evidenciado no tratamento 2, considerando a diminuição das médias de ovos e oocistos nas fezes após tratamento. Contudo, mais estudos são necessários para a determinação das doses de óleo ozonizado e do número de aplicações mais eficazes para a obtenção de melhores resultados.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Araucária, pela concessão da bolsa PIBIC, à UENP-CLM, por propiciar transporte e uso dos laboratórios, aos voluntários e proprietários dos animais que contribuíram com o presente estudo.

REFERÊNCIAS

ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal. **Annual Report 2020**. Disponível em: <<https://l1nq.com/9dDLg>>. Acesso em: 14/10/2022.

BOCCI, Velio. **Ozone. A new medical drug**. 2ª ed. Siena: Springer, 2011.

CARDOSO, Ricardo França. **Avaliação do perfil antimicrobiano do gás ozônio**. International Ozone Association, São Paulo, 2009.

Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Suínos e Aves 2003. **Sistema de Produção de Suínos**. Disponível em: <<https://l1nq.com/QINh8>>. Acesso em: 8/11/2022.

GARCIA, C. A. et al. **The use of ozonated major autohemotherapy in canine ehrlichiosis treatment: case report**. Revista del Centro Nacional de Investigaciones Científicas, 4(1), 1-10, 2010.

GONÇALVES, R. F. **Desinfecção de efluentes sanitários**. Abes, p. 171-190, 2003.

MACHADO, FCA et al. **Parasitas gastrointestinais em suínos criados em agricultura familiar na região de Patos de Minas - MG**. Research, Society and Development, v. 11, n. 10, 2022.

MODA, T. F. et al. **Efeitos da ozonização intra-abdominal e intra-retal sobre uma avaliação renal de cães acometidos por Leishmaniose Visceral**. XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica - CBEB Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, 2014.

ROEPSTORFF, A.; NANSEN, P. et al. **Epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of swine**. FAO Rome, v. 3, 1998.

SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Conheça potencialidades e desafios da suinocultura**, 2014. Disponível em: <<https://bityli.com/txDVXIVv>>. Acesso em: 14/10/2022.

SILVEIRA, CAROLINA et al. **SISTEMAS INTENSIVOS DE CRIAÇÃO DE SUINOS**. ANAIS CONGREGA MIC-ISBN 978-65-86471-05-2, v. 1, 2016.

SOUZA, T.I.M. et al. **Ação da mistura oxigênio-ozônio sobre parasitas intestinais de ovinos e caprinos**. PUBVET, Londrina, v. 4, n. 29, ed. 134, art. 910, 2010.

VELÁSQUEZ, M. T. O. et al. **Destruction of Helminth (Ascaris suum) Eggs by Ozone**. Ozone: Science and Engineering, 26(3), 359-366, 2004.

CROMOMICOSE PODAL: UM RELATO DE CASO

Data de aceite: 02/10/2023

Patrícia Maria Barbiero

Faculdade Metropolitana
Porto Velho

Pré-projeto apresentado à disciplina de Trabalho de conclusão de curso do curso de Medicina da Faculdade Metropolitana como requisito parcial à obtenção de grau de Bacharel em Medicina. Orientador: Elton Bill

RESUMO: O presente estudo tem o objetivo de descrever um relato de caso de um paciente com cromomicose podal internado do Hospital CEMETRON. Trazendo a epidemiologia, sintomas e outros pontos importantes relacionado à doença, evidenciando o contexto clínico e resolução do caso, com o objetivo de contribuir com uma revisão e dados clínicos sobre a doença. Beneficiando pacientes futuros com um adequado tratamento e atualização do tema, aprofundando os estudos sobre o tema.

ABSTRACT: The present study aims to describe a case report of a patient with foot chromomycosis admitted to CEMETRON Hospital. Bringing the epidemiology,

symptoms and other important points related to the disease, highlighting the clinical context and resolution of the case, with the aim of contributing with a review and clinical data about the disease. Benefiting future patients with an adequate treatment and updating of the subject, deepening the studies on the subject.

1 | INTRODUÇÃO

Acromomicose, comumente referida como cromoblastomicose, trata-se de uma doença fúngica polimorfa e apresentam-se como uma micose de evolução crônica, granulomatosa, que acomete a epiderme, a derme e o tecido subcutâneo. Essa doença acontece principalmente em homens, na faixa etária de 30 a 50 anos, trabalhadores rurais (CORREIA *et al.*, 2010). acomete a epiderme, a derme e o tecido subcutâneo, por se tratar de uma doença fúngica, na qual, o fungo é comumente achado na natureza nas plantas e no solo, e se inserido no organismo por meio de traumas ou ferimentos, a mesma vem acometendo muitos trabalhadores rurais, em especial,

por falta de proteção e exposição contínua, sendo hábito do agricultor trabalhar diretamente na terra, descalço ou utilizando sandálias e, frequentemente, de calças arregaçadas, facilitando o contágio (ALMEIDA *et al.*, 2014; PORTO; SOUZA, 2016).

A doença se caracteriza por apresentar lesões nodulosas e placas verrucosas que podem ulcerar, e levar a infecção secundária, linfedema, elefantíase e até carcinoma espinocelular (OLIVEIRA, 2018). Os possíveis agentes etiológicos são leveduras negras que habitam o solo e vegetais (fungos geofílicos), sendo o principal causador, o fungo *Fonsecaea pedrosoi*, por isso, é comum chamarem “doença de Fonseca” ou “doença de Pedroso” (VERRINDER VEASEY *et al.*, 2017).

O estudo busca apresentar um relato de caso clínico de um paciente que apresenta cromomicose, os exames aplicados para diagnosticar a doença e o tratamento mais adequado para esta enfermidade. Ao analisar o caso clínico, pode-se identificar e discriminar dados a respeito da situação saúde/doença da paciente, por meio de um estudo descritivo, no qual abordam-se alguns aspectos teóricos e práticos relacionados à identificação de diagnósticos.

O presente estudo faz-se importante, pois, a cromomicose não é uma doença de notificação compulsória, logo, os dados epidemiológicos são poucos conhecidos e a doença é pouco divulgada. Todavia, de acordo com Porto e Souza (2016), ainda é uma doença fúngica presente, sobretudo na população rural brasileira. Desta forma, apresenta-se esse relato de caso, contribuindo assim, com literatura médica concernente à cromoblastomicose.

Dentre as profissões, de acordo com Filho *et al.* (2020) e Oliveira (2014), os agricultores são os mais atingidos por micoses subcutâneas, visto que o ambiente de trabalho em que se encontram possuem maior probabilidade de sofrerem trauma e assim facilitar a inoculação do fungo no organismo. Associado a isso, fatores socioeconômicos podem influenciar na dificuldade de acesso a atendimento médico especializado.

2 | OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho será relatar um caso clínico de cromomicose podal em membro inferior de um paciente do sexo masculino e, discutir diagnósticos e métodos terapêuticos empregadas através de um estudo descritivo, onde foi acompanhado a evolução e tratamento da doença, trazendo assim uma contribuição científica para o tema, visto que é uma doença pouco conhecida na população e de dados epidemiológicos escassos.

3 | OBJETIVO ESPECÍFICO

- Descrever o perfil da doença;

- Apontar os aspectos clínicos evidenciados no atendimento ao paciente;
- Apresentar os achados histológicos;
- Revisar a conduta terapêutica do caso;
- Comentar a evolução do paciente.

4 | MATERIAL E MÉTODOS

Os dados do relato de caso foram coletados no Centro de Medicina Tropical de Rondônia através do professor Elton Bill. O método de diagnóstico utilizado foi exame micológico direto baseado na amostra das escamas epidérmicas das lesões. O exame micológico foi realizado com hidróxido de potássio (KOH) para fornecer visualização de estruturas leveduriformes ou filamentosas nos tecidos, além de partículas fúngicas típicas da patologia do paciente.

4.1 Critérios de inclusão:

Paciente de área rural;

4.2 Critérios de exclusão:

Crianças, mulheres;

4.3 Riscos

Há riscos mínimos quanto ao vazamento de informações e quanto ao sigilo e confidencialidade dos dados durante a coleta das variáveis: idade, gênero, profissão, localização da lesão e qual a respectiva micose nos livros de registro do Laboratório de Micologia Médica. No entanto, é assegurado o anonimato do participante, inclusive no caso de uso das imagens de lesão.

4.4 Benefícios

Não há benefícios diretos ao participante da pesquisa além do diagnóstico correto do caso suspeito de infecção fúngica, que é feito de rotina independentemente da realização da pesquisa. Mas há benefícios indiretos ao contribuir para o perfil epidemiológico de casos de infecções fúngicas de pacientes de Rondônia desde a implantação desse serviço no CEPem (que ocorreu em 2010).

4.5 Metodologia de análise dos dados

Serão descritos os métodos de coleta para avaliar as escamas epidérmicas da lesão, seguido de achados microscópicos e por fim, descrição da escolha terapêutica bem como o andamento do tratamento.

4.6 Metodologia de coleta de dados:

4.7 Cronograma

Coleta de dados e termo do aceite do paciente ocorreu dia 20.03.2023

4.8 Orçamento

O presente estudo não acarretará custos de pesquisa.

5 | CASO CLÍNICO

5.1 Descrição da paciente

Paciente do gênero masculino, agricultor, residente na cidade de São Miguel do Oeste em Rondônia, 53 anos. O paciente relata o aparecimento das lesões no ano de 2007, não procurando serviço médico de imediato. Relatou que com o passar dos meses as lesões evoluíram, com aumento do diâmetro e surgimentos em novas regiões podais. Um ano após o surgimento de lesões, em 2008, procurou uma clínica dermatológica na cidade em que reside e foi diagnosticado com cromoblastomicose podal, apesar disso, não prosseguiu com o tratamento. No ano de 2023 o paciente procurou o Centro de Medicina Tropical de Rondônia, CEMETRON e o mesmo foi encaminhado para o laboratório de Micologia Médica do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical em Porto Velho, Rondônia para realização de exame micológico.

5.2 Antecedentes

Paciente com história familiar negativa para cromomicose. Informou que a doença iniciou-se há dezesseis anos, com pequenos nódulos que evoluíram para lesões verrucosas, de forma progressiva e lentamente, sem dor. As dificuldades financeiras do paciente em dispor de transporte para acompanhamento médico retardou por anos a procura pelo tratamento.

No exame físico a paciente encontrava-se em regular estado geral, apresentava placas verrucosas de aspecto tumoral popularmente conhecida como aspecto de couve-flor, sem ulceração dor e prurido (figura 1).



Figura 1: Membro inferior afetado com placas verrucosas

Fonte: Elton Bill

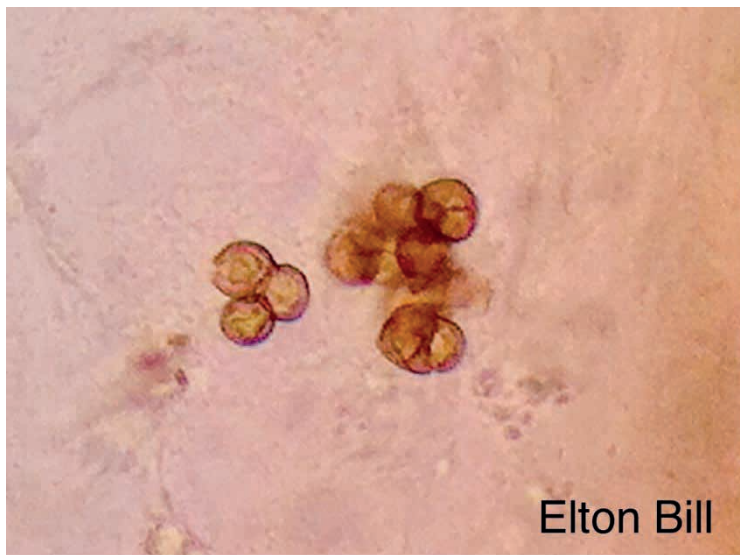
5.3 Exames complementares

Foi realizado exames de rotina, como hemograma e o exame micológico direto. O exame microscópico direto trata-se de um exame simples, baseado na análise da amostra das escamas epidérmicas das lesões (FISHER; COOK, 2001). O exame micológico foi montado com hidróxido de potássio (KOH) para visualizar estruturas filamentosas ou leveduriformes nos tecidos, bem como outros elementos fúngicos típicos que permitem definir a infecção fúngica ou o diagnóstico presuntivo de sua etiologia. Lamentavelmente resultados falso-negativos podem ocorrer, haja vista que, há casos que as amostras contêm uma quantidade pequena de estruturas fúngicas, dificultando a microscopista de observar essas estruturas e diferenciá-las dos elementos determinados pela ação do hidróxido de potássio em materiais proteináceos (BRASIL, 2003).

Neste viés, a fim de precisar o diagnóstico, poderia ter sido realizado realizado simultaneamente ao exame micológico direto o exame de cultura, que consiste em analisar amostras semeadas em sete pontos equidistantes na superfície do meio de cultura ágar Saboraud adicionado de 50 mg/l de cloranfenicol contido em placas de Petri, mantidas a temperatura ambiente ($TA = 28^{\circ}C$ a $30^{\circ}C$) e o crescimento acompanhado por um período de 7 a 15 dias. À medida que se desenvolviam colônias fúngicas, elas eram purificadas e identificadas (ALMEIDA, 2017).

6 | RESOLUÇÃO DO CASO

As placas verrugosas no membro inferior direito caracteriza um possível caso de cromomicose. Com o resultado do exame micológico direto foi possível confirmar a cromomicose. O exame clínico e micológico direto evidenciou estruturas fúngicas denominadas de corpus fumagóides.



Figuras 2 e 3: Imagens do Exame Micológico direto

Fontes: Elton Bill

A cromomicose é uma doença granulomatosa, apresentando assim achados peculiares no exame histopatológico, segundo Correia et al., (2010, p. 450). Se tivesse sido realizada a Cultura em meio Sabouraud na micromorfologia poderia ter sido identificado o agente etiológico.

A conduta terapêutica básica consiste no uso de antifúngicos orais (itraconazol, terbinafina, cetoconazol e anfotericina B). O doente iniciou tratamento, fazendo uso de Itraconazol 200 mg/dia VO. O paciente vem demonstrando boa resposta clínica a terapia medicamentosa e atualmente encontra-se em acompanhamento ambulatorial. O paciente recebeu orientação para manter acompanhamento periódico, a fim de verificar as resposta da terapia medicamentosa.

REFERÊNCIAS

CORREIA, Rafaela Teixeira Marinho et al. Cromoblastomicose: relato de 27 casos e revisão da literatura. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, p. 448-454, 2010.

DE ALMEIDA, Ana Paula Moura et al. Cromomicose: relato de caso e revisão da literatura. **Rev Soc Bras Clin Med**, v. 12, n. 1, p. 69-71, 2014.

OLIVEIRA, Raphael Simioli da Paz. Cromomicose: nem clínica comum, nem lâmina comum um relato de caso com novos destaques. 2018.

VEASEY, John Verrinder et al. Tratamento cirúrgico e seguimento a longo prazo das micoses subcutâneas causadas por fungos dermatócos: cromoblastomicose, feoifomicose e eumicetoma. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 9, n. 1, p. 29-33, 2017.

PORTO, DJ; SOUZA, EBAS. E ocorrência de cromoblastomicose em pacientes submetidos a exames micológicos no Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM) em Porto Velho, Rondônia, Brasil. **Repositório São Lucas**. 2016.

FILHO, Marcos Adelino Almeida, et al. Epidemiologia das micoses subcutâneas em um serviço público de referência dermatológica em Fortaleza, Ceará, Brasil. 2020. 11 f. SaBios: Rev. Saúde e Biol., v.15, n.1, p.7-17, jan./abr., 2020, <https://revista2.grupointegrado.br/revista/index.php/sabios/article/view/2779/1124> Acesso em: 25 out. 2021.

TECNOLOGIA ENZIMÁTICA NA SEGURANÇA ALIMENTAR (BIOSSENSORES)

Data de aceite: 02/10/2023

Antônio José de Sousa Caminha

Elisangela Santo Reis de Oliveira

Alex Fernando de Almeida

Abraham Damian Giraldo Zuniga

Ana Karla Rodrigues Dos Santos

**Luana de Araújo Nogueira Santiago
Santos**

Beatriz Rodrigues Santa Rosa

Luana Regina Pereira Alves

Dark Luzia dos Santos Neto

Maria Luciana Barbosa Mendes

RESUMO: Mesmo com as modernizações e avanços de tecnologia, a biotecnologia encontra desafios para serem implantadas e disseminadas entre o ramo comercial. Um desafio a indústria da biotecnologia são as operações de destilação, pois elas incidem significativamente no custo de produtos, por exemplo. Sendo assim, o presente trabalho busca elucidar a relação entre a manipulação e uso de enzimas para a indústria alimentícia. Tais proteínas

catalíticas podem ser usadas com relação com compostos proteicos na biossegurança de alimentos. Com mais recomendações de uso e mais testes, novas aplicações puderam ser analisadas. A busca por compostos naturais que reduzam a degradação dos alimentos, promovam maior biossegurança e que não afetem negativamente os alimentos surgiram. Como um dos principais métodos analisados, os efeitos antibióticos de enzimas ocorrem por interação do composto com os fosfolípidios da membrana plasmática. Desta forma assim, enzimas podem ser utilizadas nas seguranças de alimentos, evitando contaminação e um maior aproveitamento para consumo.

PALAVRAS-CHAVE: Enzima, indústria, biossegurança.

ABSTRACT: Even with the modernization and advances in technology, biotechnology faces challenges to be implemented and disseminated among the commercial sector. A challenge for the biotechnology industry is the distillation operations, as they have a significant impact on the cost of products, for example. Therefore, the present work seeks to elucidate the relationship between the manipulation and use of enzymes for the

food industry. Such catalytic proteins can be used in connection with protein compounds in food biosafety. With more usage recommendations and more tests, new applications could be analyzed. The search for natural compounds that reduce food degradation, promote greater biosecurity and that do not negatively affect food has emerged. As one of the main methods analyzed, the antibiotic effects of enzymes occur through the interaction of the compound with the phospholipids of the plasmatic membrane. In this way, enzymes can be used in food safety, avoiding contamination and greater use for consumption.

KEYWORDS: Enzyme, industry, biosecurity.

1 | INTRODUÇÃO

Diversos processos biotecnológicos historicamente vêm sendo utilizados na produção de diversos produtos, principalmente alimentos, desde a mais remota antiguidade. Os registros históricos fazem referência ao preparo de bebidas fermentadas a partir de cereais na Babilônia e no Egito (8.000 a 6.000 anos a.C.), à produção de pão, utilizando fermentos, no Egito (4.000 anos a.C.) e à produção de vinhos na Grécia (2.000 a.C.).

A Biotecnologia no atual momento da história humana, encontra muitas aplicações importantes nas áreas de agricultura, pecuária, saúde, preservação do meio ambiente e indústria. Borzani, (2001), em seu capítulo “Engenharia Bioquímica: uma aplicação *suís generis* da engenharia química” lembra do impacto para esse tema ocorrido na segunda guerra mundial com a produção de penicilina em escala industrial, provando com dados históricos a importância do tema mesmo decorridos mais de meio século.

Um desafio a indústria da biotecnologia são as operações de destilação, pois elas incidem significativamente no custo do produto, em virtude da energia necessária para a sua execução, sendo que estas operações de recuperação do produto podem ser responsáveis por 50 a 70% do custo do produto.

Sobre a origem dos isolamentos de microrganismos, há fontes distintas, tanto de culturas comerciais ou advinda de recursos naturais, tais como solo, água, plantas etc., sempre foi uma atividade de grande importância para a obtenção de novas linhagens de interesse industrial. A maioria das grandes empresas como por exemplo as produtoras de antibióticos, ou enzimas, mantêm programas de isolamento de linhagens de recursos naturais, justamente com o objetivo de incrementar a produção de certos produtos, ou com o objetivo de encontrar linhagens produtoras de novos antibióticos. Assim também pode ser aplicado as diversas linhagens de interesse da indústria na área da biotecnologia.

Os fragmentos de DNA podem ser introduzidos por meio dos plasmídeos como vetores, permitindo a obtenção de células alteradas geneticamente. Por esse mecanismo a área biotecnológica pode explorar esse campo e desenvolver compostos que tenham interesse nas diversas áreas de aplicação.

Dentre as diversas áreas de importância para a humanidade a segurança alimentar constitui-se uma necessidade prioritária conforme elencado pelos governos

bem como organismos internacionais como a OMS. As Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA), são as síndromes causadas por cerca de 250 microrganismos que são contaminantes de alimentos e água, usando os mesmos como veículo de infecção para o organismo humano (BRASIL, 2021).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 600 (seiscentos) milhões de pessoas contraem doenças transmitidas por alimentos e água (DTHA) contaminados por ano, o que representa para a instituição que 1 (um) em cada 10 (dez) habitantes do planeta sofreram algum tipo de transtorno de saúde por meio de DTHA. Desses doentes, cerca de 420 mil morrem em função da doença (PAHO/OMS, 2022).

Neste sentido, pesquisadores como Shao et al, (2020), demonstraram uso de probióticos com leveduras *Leuconostoc. mesenteroides* com efeito supressor na formação de biofilmes de *Listeria monocytogenes* de até 10 vezes com a cepa W51, Cocultivados com quatro isolados probióticos de kimchi (*Lactobacillus casei* Cab18, *L. pseudomesenteroides* Cab21, *L. mesenteroides* W51, e *L. mesenteroides* Com75) indicando que *Leuconostoc spp* produz os probióticos que reprimem a formação de biofilme de *L. monocytogenes* sem alterar seu crescimento.

Nas pesquisas desenvolvidas por Abdolshahi et al., 2018, citado por Silva e Stamford (2021) buscou conhecer e descrever outro promissor aspecto de utilização das MP (manoproteínas) na qualidade e segurança alimentar, investigando aspectos pouco descritos na literatura como o possível efeito bioprotetor contra aflatoxinas. Os testes utilizaram soluções apenas com MP (25 e 50 mg/ml) e MP revestidas em gelatina (3,5: 1,5) com tempo de exposição de 5, 15, 30, 60, 120 e 180 min, as MP sem associações ligaram-se a 80% e revestidas 85% das aflatoxinas nos primeiros 5 min. Diante de tais resultados eles observaram que sozinhas ou incorporadas em revestimento à base de gelatina, apresentaram glicoproteínas bioativas com potencial de aplicação para reduzir o nível de aflatoxina em pistache contaminado. Na figura 01 é apresentado uma representação esquemática das MP.

O uso de enzimas para trazer maior segurança aos alimentos tem sido demonstrado por vários pesquisadores, dentro desse universo foram desenvolvidos os biossensores. Estes são dispositivos que acoplam compostos biológicos (enzimas, anticorpos ou DNA) a transdutores que transformam o sinal de reconhecimento do analito em uma medida analítica. São sensores modificados com material biológico intimamente ligado à superfície de um transdutor.

Os mecanismos de atuação são de variados tipos, merecendo destaque aqueles em que o monitoramento do analito é baseado no princípio de inibição da enzima, na qual a atividade é medida antes e após a inibição. Neste processo ocorre a medição pela exposição da enzima a um inibidor específico, por um determinado tempo, esse porcentual de inibição ocorrido com a enzima está quantitativamente relacionada com a concentração deste agente inibidor (MARQUES e YAMANAKA, 2008).

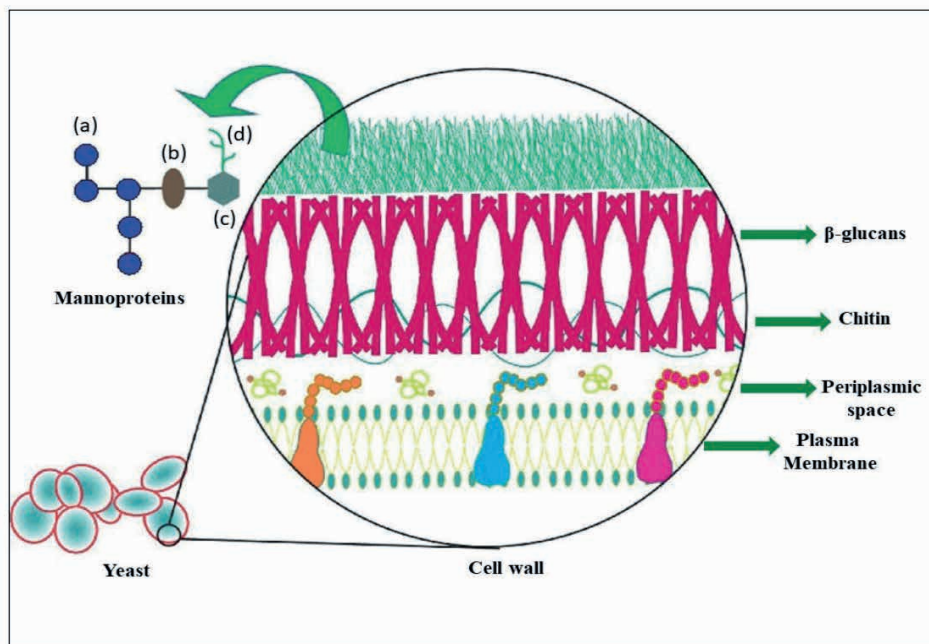


Figura 1. Representação esquemática da estrutura das manoproteínas da parede celular da *Saccharomyces cerevisiae* (a) manose; (b) fosfato; (c) etanolamina; (d) proteína

Fonte: Silva e Stamford (2021)

2 | ENZIMAS E COMPOSTOS PROTEICOS NA BIOSSEGURANÇA DE ALIMENTOS

2.1 Bacteriocinas

O uso de compostos naturais tem sido alvo de grande esforço das pesquisas e indústrias da área de alimentos, vem ganhando cada vez mais destaque o uso de peptídeos antimicrobianos de origem bacteriana. As chamadas enterocinas ou bacteriocinas, são obtidas do cultivo de várias espécies do gênero *Enterococcus* e outros microorganismos também como o gênero *Leuconostoc*. No caso do gênero *Enterococcus* são caracterizados como peptídeos antimicrobianos sintetizados nos ribossomos e liberados no meio extracelular. Além disso, devido à sua atividade antagônica, as enterocinas atuam contra diversas espécies Gram positivas e Gram negativas, principalmente contra *Listeria spp* (BUSSOLO et al 2022).

Em seu trabalho, Bussolo et al, (2022) ao realizar a análise ultraestrutural de *L. monocytogenes* CLIP2032 e *L. innocua* Células CLIP12612 (Figura 2), observou a ocorrência de dano à membrana, comprovado pelo encolhimento ou ruptura celular; esse resultado ocorreu em função do uso de enterocinas produzidas em meio de cultura com o uso de resíduos da produção de soja. As enterocinas de classe II podem induzir a

formação de poros na membrana celular, ligando-se ao sistema manosefosfotransferase e influenciando a viabilidade celular. Segundo o pesquisador diversos relatórios sugerem que a ruptura celular causada pela bacteriocina é o mecanismo semelhante de atuação em patógenos transmitidos por alimentos (BUSSOLO et al 2022).

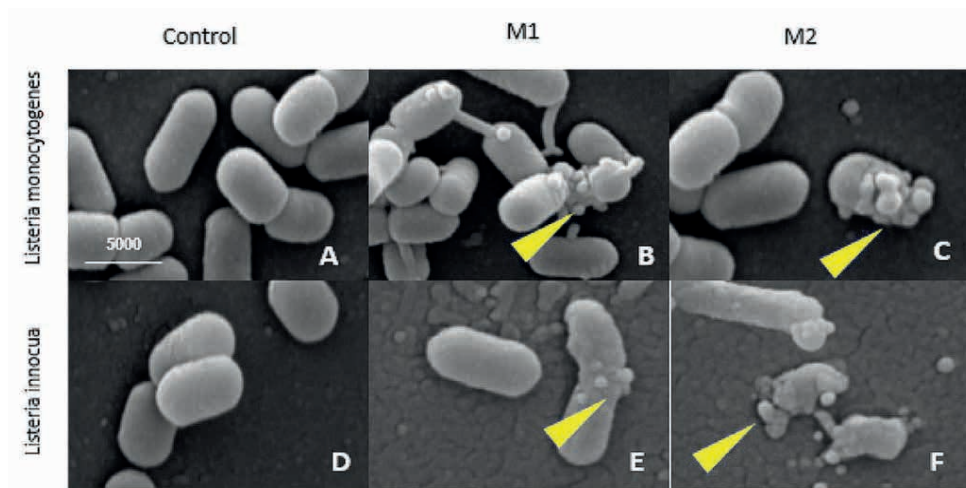


Figura 2 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM) de *L. monocytogenes* e pós tradução com enterocinas obtidas nos meios M1 e M2 de soja em aumento de 50.000x. As setas amarelas indicam dano celular.

Fonte: Bussolo et al, (2022).

Na busca por compostos naturais que reduzam a degradação dos alimentos, promovam maior biossegurança e que não afetem negativamente os alimentos surgiram compostos como a nisina, que é considerada um dos marcos mais importantes da pesquisa envolvendo bacteriocinas, conjunto de compostos celulares com potencial microbicida. Comercializada desde 1953, é utilizada até hoje na produção de diferentes alimentos em escala industrial. É o único peptídeo antimicrobiano natural aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso como conservante de alimentos.

A bacteriocina nisina, se constitui de um peptídeo sintetizado por bactérias comuns lacteas. Cerca de 40 espécies conhecidas de *Lactococcus lactis subsp. lactis*, 35 sintetizam nisina. A capacidade de produção se encontra geneticamente ligada à capacidade de fermentar sacarose; está em um grupo de peptídeos produzidos ribossomicamente; pertence à classe dos lantibiótico e à subclasse Ia; identificação internacional INS como E234.

As atividades desta bacteriocina afeta várias espécies, incluindo *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Listeria* e *Micobacterium*, atinge também células vegetativas e esporos de *Bacillus* e *Clostridium*. Como citado anteriormente é produzida naturalmente em processos fermentativos de vários alimentos, sobretudo produtos lácteos, há relatos históricos de

consumo desses produtos há muitos séculos.

As ações da nisina como bacteriocina afeta especialmente bactérias Gram positivas, sendo especificamente usada pela indústria de queijos para controlar o crescimento de *Clostridium spp.* Estas ações têm sido alvo de diversos estudos que têm avaliado a eficácia da nisina sobre patógenos, como consequência seu uso em diferentes produtos alimentícios tem sido bastante empregado, como, por exemplo, na inibição do crescimento microbiano em queijos, sucos de fruta, carne moída, salsichas, produtos enlatados, derivados do leite e cerveja (ADITIVOSINGREDIENTES.COM).

O efeito antibiótico ocorre por interação do composto com os fosfolipídios da membrana plasmática, essa ação do peptídeo provoca a formação de poros na membrana, e como ação semelhante ao sistema complemento dos organismos animais mais evoluídos, ocasionam o efluxo do material intracelular. Assim, após o tratamento com nisina, as células ficam sem energia suficiente para realizar processos biossintéticos e que a membrana plasmática, transdutora de energia, pode ser o alvo primário na atuação da nisina. Sendo a bacteriocina carregada positivamente com partes hidrofóbicas, ocorrem interações eletrostáticas com o grupamento fosfato da membrana celular, carregado negativamente, promovendo o início da ligação da bacteriocina com a célula-alvo.

Outros autores consideraram a ação antimicrobiana e o rendimento considerável das enterocinas ou bacteriocinas, com potencial para obtenção de peptídeos antimicrobianos para conservação de alimentos, uma vez que esses compostos devem ser aplicados com base em sua atividade e modo de ação, devendo ser desenvolvidos em condições que reproduzam as utilizadas em produtos alimentícios (BUSSOLO et al 2022).

As enterocinas podem ter seu uso em diversas formas nos alimentos, servindo como aditivos como conservantes de alimentos a partir da incorporação da cultura iniciadora da bactéria produtora e do extrato bruto da própria bacteriocina ou através da incorporação de bacteriocina purificada.

Existem pesquisas e trabalhos publicados que comprovam o efetivo benefício destes compostos na segurança dos alimentos, porém os meios comerciais utilizados para a obtenção das bacteriocinas continuam sendo um desafio, os altos custos e o baixo rendimento da produção em larga escala tem inviabilizado seu emprego nesta atividade comercial (BUSSOLO et al 2022).

2.2 Embalagens inteligentes e biossensores

O consumo de alimentos embalados aumentou consideravelmente nas últimas décadas. As embalagens acompanharam o desenvolvimento das sociedades, que reduziram a quantidade de membros por família, ingresso das mulheres no mercado de trabalho e a necessidade de alimentos cada vez mais processados e em quantidades adequadas as famílias e que pudessem ser armazenados para consumo sem ocorrer deterioração e conservando suas propriedades nutricionais.

O mercado global de embalagens cresce a uma taxa anual de 5%, esse mercado mundial de alimentos embalados foi estimado em US\$ 1,9 trilhão em 2020, os analistas de mercado preveem que possa chegar a cifra de US\$ 3,4 trilhões até 2030 (ROY et al., 2022). Na mesma vertente desse aumento considerável de produção de embalagens, cresce também a preocupação global com o impacto ambiental, visto que a maioria das embalagens de alimentos é desenvolvida a partir de polímeros à base de petróleo, projetadas para uso único e descartadas após curtos períodos. Seguindo as diretrizes globais pactuadas na ONU, as ODS, incentivam como metas para os governos globais criar as alternativas para diminuir o impacto ambiental, garantir a qualidade e segurança dos alimentos com a substituição destas por embalagens biodegradáveis com propriedades ativas e inteligentes (LIMA et al, 2022)

Neste contexto, a substituição das embalagens derivadas de petróleo por embalagens biodegradáveis estimulou o desenvolvimento de embalagens chamadas ativas devido suas propriedades interagirem com o alimento e ao mesmo tempo com o consumidor. É um campo em desenvolvimento dinâmico com grandes perspectivas de mercado e surge a partir de uma proposta inovadora na área de embalagens de alimentos que visa atender às demandas do mercado, como a preferência dos consumidores por alimentos seguros, saudáveis e de alta qualidade (CAETANO et al., 2022).

As embalagens consideradas ativas, estão em um sistema constituído por três partes: substância ativa, material de embalagem e alimento. Nesta modalidade de embalagem, ocorre interação com alimento, mantendo assim a qualidade nutricional e inibindo o crescimento de microrganismos ou prevenindo a migração de contaminantes. Um destaque a esse tipo de embalagem deve ser dado as antimicrobianas, posto seu impacto na conservação e segurança dos alimentos ofertados a população (CAETANO et al, 2022).

As embalagens ativas antimicrobiana incorporam compostos específicos no material da embalagem, com isso a indústria de alimentos busca proteger os alimentos de bactérias deteriorantes. Essa inibição da deterioração pode ocorrer através do contato direto ou indireto. No contato direto, ocorre interação entre o material da embalagem e os alimentos, já no contato indireto, ocorre através da liberação de um agente antimicrobiano volátil no headspace da embalagem. Como já citado anteriormente, está comprovado que o uso dos sistemas de embalagens ativas antimicrobianas prolonga a vida útil dos alimentos, garantem a segurança alimentar e retardam os ciclos de crescimento microbiano. Na literatura existem vários trabalhos que avaliaram também biopolímeros aliados a óleos essenciais visando a aplicação em embalagens ativas, o que demonstra o vasto campo ainda a ser explorado (CAETANO et al, 2022).

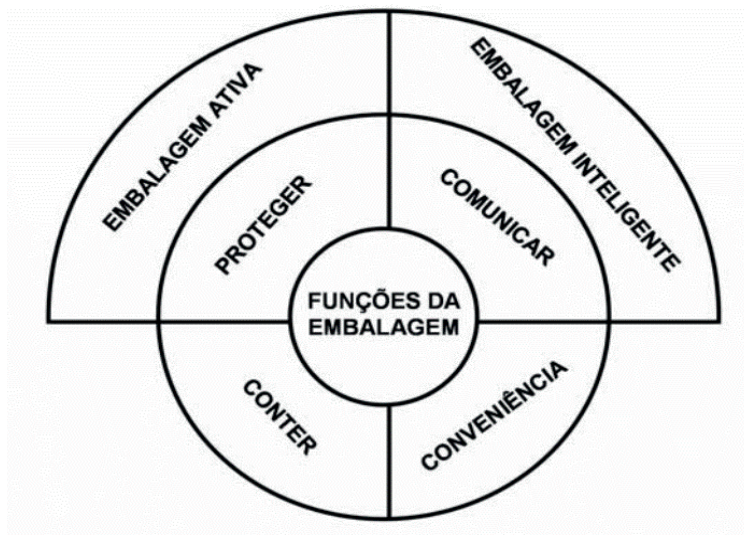


Figura 3. Funções básicas das embalagens e interfaces de atuação das embalagens ativas e inteligentes.

Fonte: Braga e Perez, (2010)

Esse campo de pesquisa trouxe grandes possibilidades que podem ser incorporados nos sistemas, aditivos que apresentem propriedades, por exemplo, antioxidantes (naturais ou sintéticos), antibacterianos, bloqueadores de luz ou controladores de gás. Outro destaque dentre os aditivos mencionados, podemos citar os antioxidantes pela sua grande importância, pois inibem as reações de oxidação que levam à degradação dos alimentos e impedem a formação de alguns compostos tóxicos que levam a perda do alimento (LIMA et al, 2022).

Outro campo bastante promissor em franco desenvolvimento são as chamadas embalagens inteligentes desenvolvidas baseadas em biossensores e nanotecnologia, denominadas em referência a sua interação com o consumidor, mostrando o estágio de maturação do produto a exemplo das frutas, deterioração a exemplo dos produtos cárneos, com o uso de sensores de qualidade. Alguns desses sensores são conhecidos como língua ou nariz eletrônico, que mostram, por exemplo, as alterações de cor quando o produto estiver impróprio ao consumo. Entre as capacidades desse sistema, podemos citar a indicação de temperatura, tempo de consumo; estes são indicadores de gás, sensores de umidade, biossensores ópticos, calorimétricos, eletroquímicos, apresentam um histórico sobre condições de armazenamento, rastreabilidade, crescimento microbiano e composição do alimento (ONGARATTO et al., 2022).

O primeiro trabalho publicado sobre um biossensor utilizando uma enzima foi realizado por Clark e Lyons em 1962, onde para medir a glicose em amostras biológicas foi utilizada a estratégia de detecção eletroquímica de oxigênio ou peróxido de hidrogênio

usando glicose oxidase imobilizada num eletrodo (ARÁMBULO, 2023). Podemos citar o uso da acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE) na detecção de pesticidas organofosforados em alimentos, já que esses compostos provocam nessas enzimas uma inibição irreversível, podendo também ser utilizadas ao final da reação as enzimas colinesterase (ChE) e colina oxidase (ChO). Também se pode usar a enzima organofosforado hidrolase (OPH), purificada e extraída a partir das células da bactéria *Brevundimonas diminuta* para a detecção direta desses compostos nocivos (COSTA et al., 2022).

O funcionamento dos biossensores utilizados nas embalagens ativas, apresentam o seguinte mecanismo de funcionamento (figura 04), o analito, contido na amostra, ao entrar em contato com o elemento de reconhecimento, provoca uma mudança físico-química (variação de calor, índice de refração, resistência elétrica, etc.) que pode ser identificado pelo transdutor. O transdutor age como uma interface, processa e converte esse sinal químico em sinal mensurável. Na etapa seguinte, a unidade processadora de sinal irá amplificar o sinal e transferi-lo para um monitor ou dispositivo, onde a visualização de dados informará ao usuário se o analito foi ou não identificado e a sua concentração na amostra (OLIVEIRA e PEREIRA, 2016).

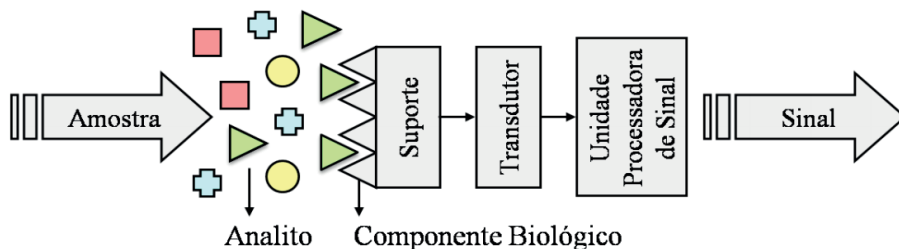


Figura 4. Esquema de um biossensor, mostrando a organização dos seus componentes.

Fonte: Oliveira e Pereira, 2016.

Com as inovações na área de embalagens inteligentes, espera-se que o consumidor fique menos dependente das datas de validade para confiar o frescor dos alimentos. As embalagens inteligentes com capacidades de detectar alterações biológicas, químicas e físicas nos alimentos são consideradas um grande progresso para indústria de alimentos, sendo considerados os indicadores de frescor e de tempo-temperatura (TTI) e os grupos de embalagens inteligentes mais importantes para carnes (ONGARATTO et al., 2022).

O desenvolvimento de embalagens ativas está dividido em duas categorias principais. A primeira refere-se aos absorventes ou captadores. Como o próprio nome sugere, estas atuam removendo do produto agentes indesejáveis, como oxigénio, dióxido de carbono, etileno e água em excesso. A segunda categoria está relacionada com sistemas de libertação, que adicionam ativamente ou emitem compostos para os alimentos

embalados. Na Tabela 1, são apresentados vários sistemas de embalagens ativas.

EMBALAGENS ATIVAS	COMPONENTES QUÍMICOS	FÓRMULA MOLECULAR	APLICAÇÕES
Absorvedor de oxigênio	Óxido de ferro	FeO	Queijos, leite, café, chás, produtos cárneos, produtos de panificação
	Carbonato ferroso	FeCO ₃	
	Ácido ascórbico	C ₆ H ₈ O ₆	
	Sorbitol	C ₆ H ₁₄ O ₆	
	Catecol	C ₆ H ₆ O ₂	
Absorvedor de etileno	Óxido de alumínio	Al ₂ O ₃	Vegetais e frutas
	Permanganato de potássio	KMnO ₄	
	Ozônio	O ₃	
Absorvedor de umidade	Silica gel (silicato de sódio + ácido sulfúrico)	Na ₂ SiO ₃ + H ₃ PO ₄	Frutas, vegetais, produtos congelados e de padaria
	Propilenoglicol	C ₃ H ₈ O ₂	
	Poli(álcool vinílico)	(C ₄ H ₆ O ₂) _n	
Absorvedor de dióxido de carbono	Hidróxido de cálcio	Ca(OH) ₂	Café torrado, produtos desidratados
	Hidróxido de potássio	KOH	
	Carbonato ferroso	FeCO ₃	
	Óxido de cálcio	CaO	
Sistemas antimicrobianos	Ácido sórbico	C ₆ H ₈ O ₂	Alimentos frescos e processados, vegetais, frutas secas, arroz, feijão e produtos de padaria
	Ácido benzóico	C ₆ H ₅ COOH	
	Ácido propiônico	C ₃ H ₆ O ₂	
	Triclosan	C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O ₂	
	Dióxido de enxofre	SO ₂	
	Etanol	C ₂ H ₆ O	
	Prata, nanopartícula de prata	Ag	
	Cloreto de sódio	NaCl	
	Óleos essenciais (ex.: alecrim, cravo, tomilho, orégano)		
Sistemas antioxidantes	Ácido ascórbico	C ₆ H ₈ O ₆	Frutas e vegetais
	Quercetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	
	Butil hidroxitolueno	C ₁₅ H ₂₄ O	
Emissor de dióxido de carbono	Ácido ascórbico	C ₆ H ₈ O ₆	Vegetais e frutas, peixes, carnes e aves
	Carbonato de ferro	FeCO ₃	
Emissor de etanol	Etanol	C ₂ H ₆ O	Produtos de panificação e peixe

FONTE: Adaptado de AHVENAINEN; HURME, 1997; KRUIJF *et al.*, 2002; OZDEMIR; FLOROS, 2004; SOUZA *et al.*, 2004; CHEN *et al.*; 2012; KANMANI; LIM, 2013).

Tabela 1. Relação de embalagens ativas (sistemas absorventes e emissores), componentes químicos utilizados e suas aplicações.

Fonte: Braga e Silva, 2017.

Outro exemplo claro de uso de biossensores está na indústria cervejeira e de outras bebidas alcoólicas, os biossensores são utilizados como instrumentos de segurança uma vez que podem detectar e quantificar o etanol, e assim garantir uma rotulagem correta. Para isso pode-se usar a enzima álcool oxidase através de biossensores eletroquímicos (ALI, 2019).

3 | AÇÃO DAS ENZIMAS NA SEGURANÇA DOS ALIMENTOS

Uma das principais contribuições das enzimas para a segurança alimentar é a sua capacidade de quebrar compostos indesejáveis, como toxinas, anti-nutrientes e resíduos químicos. A ação enzimática controlada em alimentos fermentados, por exemplo, é essencial para evitar a contaminação bacteriana indesejável e garantir a segurança dos alimentos fermentados. As enzimas também têm um papel crucial na detecção e controle de fraudes alimentares. Por meio de técnicas avançadas, é possível identificar adulterações em alimentos por meio da análise de atividades enzimáticas específicas. Essa abordagem pode revelar a presença de ingredientes impróprios ou falsificados, proporcionando uma camada adicional de proteção ao consumidor (ARÁMBULO, 2023).

O metabolismo microbiano também pode ser detectado por biossensores enzimáticos, uma vez que algumas bactérias podem metabolizar diferentes substâncias, gerando produtos que são substratos de determinadas enzimas. Usando a enzima arginina descarboxilase é possível detectar diaminas que são frutos do metabolismo microbiano, e assim, detectar produtos alimentícios contaminados (TEXEIRA, 2021).

Fora do escopo dos biossensores, as enzimas podem auxiliar na proteção a alimentos embalados, objetivando, por exemplo, a contenção do oxigênio nas embalagens, resultando no enfraquecimento das taxas do metabolismo microbiano e promovendo o aumento do tempo de prateleira. É o caso das enzimas álcool oxidase, lactase e glicose oxidase, que podem ser utilizadas para diminuir a atmosfera oxidante dentro das embalagens (BARBOSA, 2023).

REFERÊNCIAS

- ALI, M. A. **Ethanol bioelectrocatalysis using alcohol dehydrogenase on quinone-functionalized carbon-based electrodes: from molecular electrochemistry to *operando*-electron paramagnetic resonance approach**. 2019. Tese (Doutorado) – Doutorado em Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.
- ARÁMBULO, P. C. S. **Desenvolvimento de Biossensores baseados em aptâmeros para detecção de saxitoxina por impedância eletroquímica**. 2023. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-Graduação em Física, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2023.
- BARBOSA, E. G. **Embalagens ativas e suas aplicações na conservação de alimentos**. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) - Especialização em Inovação e Tecnologia para Alimentos e Bebidas, Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Caxias do Sul, 2023.
- BECKER, M. M.; RIBEIRO, E. B.; MARQUES, P. R. B. O.; MARTY, J. L.; NUNES, G. S.; CATANANTE, G. **Development of a highly sensitive xanthine oxidase-based biosensor for the determination of antioxidant capacity in Amazonian fruit samples**. *Talanta*, 204, 626–632, 2019.
- BRAGA, L. F. SILVA, R. M. Embalagens ativas: uma nova abordagem para embalagens alimentícias. **Brazilian Journal of Food Research**, Campo Mourão, v. 8 n. 4, p. 170-186, out./dez. 2017.

- COSTA, A. R. C.; RIBEIRO, E. B.; RIBEIRO, D. B.; BLASQUES, R. V.; MARQUES, P. R. B. O.; NUNES, G. S. **Biossensores à Base de Acetilcolinesterase para Detecção de Pesticidas organofosforados: Tendências e Perspectivas.** Revista Virtual de Química, v. 14, n. 2, 2022.

- DALKIRAN, B. **Amperometric determination of heavy metal using an HRP inhibition biosensor based on ITO nanoparticles-ruthenium (III) hexamine trichloride composite:** Central composite design optimization. Bioelectrochemistry, v. 135, 2020.

- LIU, L.; CHEN, C.; CHEN, C.; KANG, X.; ZHANG, H.; TAO, Y.; XIE, Q.; YAO, S. **Poly(noradrenalin) based bi-enzyme biosensor for ultrasensitive multi-analyte determination.** Talanta, v. 194, p. 343–349, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.10.055>.

- ONGARATTO, Gabriela Cavalcá; VITAL, Ana Carolina Pelaes; DO PRADO, Ivanor Nunes. **Embalagens ativas e inteligentes para proteção da carne e seus derivados: Revisão.** Pubvet, v. 16, p. 207, 2022.

PANAFTOSA alerta que doenças transmitidas por alimentos podem ser evitadas com ações preventivas do campo à mesa. PAHO, 2022. Disponível em: < <https://www.paho.org/pt/noticias/7-6-2022-panaftosa-alerta-que-doencas-transmitidas-por-alimentos-podem-ser-evitadas-com> >. Acesso em: 04 jan. 2023.

- RATO, Nuno; GASPAR, Pedro Dinis. **Active and intelligent packaging-Principles of operation, characteristics and applications.** Bússolo, Talita Butzke, Cassia Milena De Souza, Nathália Aparecida Andrade De Souza, Márcia Cristina Furlaneto, Evandro Bona, and Luciana Furlaneto-Maia. "Soybean Flour as a Substrate to Obtain Enterococcus Durans Bacteriocins." Ciência E Agrotecnologia 46 (2022): Ciência E Agrotecnologia, 2022, Vol.46. Web.

- SHINOHARA, N. K. S.; OLIVEIRA, F. H. P. C. **Desafios e Estratégias para a segurança alimentar mundial.** Campina Grande: Editora Ampla, 356p. 2022.

- SILVA, M. K. L. da. CESARINO, I. **Desenvolvimento de biossensores para controle de pesticidas em alimentos.** SHMIDELL, W. et al; BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL VOL II. ED. EDGARD BLÜCHER LTDA. 2008.

- TEIXEIRA, A. B. M. **Ferramenta ótica para controlo alimentar: avanços no perfil metabólico das aminas biogénicas e validação de um biossensor ótico.** 2021. Dissertação (Mestrado) – Curso de Biorrecursos, Instituto Superior de Engenharia do Porto, Porto, Portugal, 2021.

- TRAVAGIN, B. N. F. S. **Estudo da formação de biofilmes de Listeria monocytogenes frente a diferentes condições encontradas em laticínios.** 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010. doi:10.11606/D.11.2010.tde-20102010-104203. Acesso em: 20 de julho de 2023.

UFRJ, 2022. **Bacteriocinas, antibióticos do futuro.** Disponível em: <https://www.microbiologia.ufrj.br/portal/index.php/pt/destaques/novidades-sobre-a-micro/303-bacteriocinas-antibioticos-do-futuro> acesso em: 30 de abril de 2023.

VERRUCK. S. **Avanços em ciência e tecnologia de alimentos.** Vol. 3. Científica Daiatal. Guarujá, SP. 2021.

PRODUÇÃO DA CERVEJA ARTESANAL: APLICAÇÃO DAS ENZIMAS NO PROCESSO DE PRODUÇÃO

Data de submissão: 09/08/2023

Data de aceite: 02/10/2023

Beatriz Rodrigues Santa Rosa

Universidade Federal do Tocantins
Palmas - Tocantins
<https://lattes.cnpq.br/6263052491361800>

Ana Karla Rodrigues Dos Santos

Universidade Federal do Tocantins
Palmas - Tocantins
<http://lattes.cnpq.br/6022052230588791>

Antônio José de Sousa Caminha

Universidade Federal do Tocantins
Palmas - Tocantins
<http://lattes.cnpq.br/2647162881176317>

Elisangela Santo Reis de Oliveira

Universidade Federal do Tocantins
Palmas - Tocantins
<http://lattes.cnpq.br/9806120763323839>

Luana de Araújo Nogueira Santiago

Universidade Federal do Tocantins
Palmas - Tocantins
<http://lattes.cnpq.br/8692598507249516>

Luana Regina Pereira Alves

Universidade Federal do Tocantins
Palmas - Tocantins
<http://lattes.cnpq.br/1225108605600848>

Alex Fernando de Almeida

Universidade Federal do Tocantins
Palmas - Tocantins
<http://lattes.cnpq.br/3042922895338679>

Sergio Andres Villalba Morales

Universidade Federal do Tocantins
Palmas - Tocantins
<https://lattes.cnpq.br/7673526126442085>

RESUMO: O segmento da indústria cervejeira vem ganhando destaque acompanhado de um processo de crescimento do mercado das cervejarias artesanais. Atualmente, existe uma grande variedade na produção de cervejas, com diferentes formulações, sendo esta uma importante atividade econômica para diversos países. A cerveja é a bebida alcoólica de maior consumo no Brasil, sendo este também o maior produtor. As cervejas artesanais tem em seu processo de produção características únicas, trazidas por diversas formulações que contêm não apenas os ingredientes básicos de fabricação da cerveja industrial (água, malte, lúpulo e levedura), como também a adição de especiarias, como frutas, café, pimentas e até mesmo gengibre. Dentre os ingredientes utilizados na produção de cerveja o malte se destaca como principal matéria-prima na produção da bebida. Os cereais mais utilizados para a malteação dos seus grãos são apenas a cevada, o trigo

e o centeio, devido a sua capacidade de desenvolvimento das enzimas alfa e beta-amilases durante a sua germinação. As enzimas desempenham um papel fundamental na qualidade da cerveja, afetando características como: teor alcoólico, corpo, clarificação e estabilidade da espuma. A utilização das enzimas comerciais para a produção de cerveja se dá durante a mosturação como complementação ou substituição da atividade enzimática naturalmente presente no malte, sendo insuficiente para realizar uma conversão satisfatória, as enzimas exógenas são adicionadas com o objetivo de maior controle, velocidade e padronização do processo. Neste capítulo serão abordados o processo de produção da cerveja artesanal, as matérias-primas utilizadas em cada etapa da produção, o papel das enzimas em todas as fases, os aditivos permitidos pela legislação brasileira, além das tendências, inovações e desafios no setor cervejeiro.

PALAVRAS-CHAVE: Cerveja artesanal, Processo de produção, ingredientes, enzimas comerciais.

CRAFT BEER PRODUCTION: ENZYME APPLICATION ON THE PRODUCTION PROCESS

ABSTRACT: The segment of the beer industry has been gaining prominence alongside a growth process in the craft brewery market. Currently, there is a wide variety in beer production, with different formulations, making it an important economic activity for several countries. Beer is the most consumed alcoholic beverage in Brazil, which is also the largest producer. Craft beers have unique production characteristics, brought about by various formulations that include not only the basic brewing ingredients (water, malt, hops, and yeast) but also the addition of spices like fruits, coffee, peppers, and even ginger. Among the ingredients used in beer production, malt stands out as the primary raw material for brewing. The grains of barley, wheat, and rye are the most commonly used for malting due to their ability to develop alpha and beta-amylase enzymes during germination. Enzymes play a crucial role in beer quality, affecting characteristics such as alcohol content, body, clarification, and foam stability. The use of commercial enzymes in beer production occurs during mashing as a complement or replacement for the enzymatic activity naturally present in malt. Since this is often insufficient to achieve satisfactory conversion, exogenous enzymes are added with the aim of enhancing control, speed, and standardization of the process. This chapter will address the craft beer production process, the raw materials used in each production stage, the role of enzymes in all phases, additives allowed by Brazilian legislation, as well as trends, innovations, and challenges in the beer industry.

KEYWORDS: Craft Beer, Production Process, Ingredients, Commercial Enzymes.

1 | INTRODUÇÃO

A cerveja é a bebida alcoólica de maior consumo no Brasil, sendo este também o maior produtor, ficando atrás apenas, da China e dos Estados Unidos, podendo alcançar em 2023 o volume de produção de 16,1 bilhões de litros, representando um crescimento de 4,5% em relação ao ano de 2022, segundo dados do Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja (SINDICERV, 2022).

A Instrução Normativa nº 65 de 10 de dezembro de 2019, define a cerveja como uma bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, e “submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo, hipótese em que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjunto cervejeiro” (BRASIL, 2019).

Consideram-se adjuntos cervejeiros a cevada não malteada e os demais cereais malteados ou não-malteados aptos para o consumo humano como alimento. Também são considerados adjuntos cervejeiros o mel e os ingredientes de origem vegetal, fontes de amido e de açúcares, aptos para o consumo humano como alimento, onde a quantidade máxima empregada desse conjunto de adjuntos definidos, deve ser menor ou igual a 25% em peso em relação ao extrato primitivo (BRASIL, 2019).

No Brasil, é observado um grande crescimento das cervejarias artesanais, que tem como diferenciais a produção em menor escala e as inúmeras possibilidades de inovar com ingredientes locais, naturais e livres de conservantes criando um mercado diferenciado podendo ser atendido pelo cervejeiro artesanal, profissional capaz de atender um mercado mais restrito e exigente, que preza pela qualidade e alta variedade de estilos (CERVBRASIL, 2021; MARCUSSO, 2015).

As cervejas artesanais tem em seu processo de produção características únicas, trazidas por diversas formulações que contêm não apenas os ingredientes básicos de fabricação da cerveja industrial (água, malte, lúpulo e levedura), como também a adição de especiarias, como frutas, café, pimentas e até mesmo gengibre (LEMOS, 2017)

Dentre os ingredientes utilizados na produção de cerveja o malte se destaca como principal matéria-prima na produção da bebida sendo responsável pela textura, cor, aroma e o sabor. Os cereais mais utilizados para a malteação dos seus grãos são apenas a cevada, o trigo e o centeio, devido a sua capacidade de desenvolvimento das enzimas alfa e beta-amilases durante a sua germinação (FLORES; WATANABE, 2014).

As enzimas desempenham um papel fundamental na qualidade da cerveja, afetando características como: teor alcoólico, corpo, clarificação e estabilidade da espuma. A utilização das enzimas comerciais para a produção de cerveja se dá durante a mosturação como complementação ou substituição da atividade enzimática naturalmente presente no malte, sendo insuficiente para realizar uma conversão satisfatória, as enzimas exógenas são adicionadas com o objetivo de maior controle, velocidade e padronização do processo. Na fermentação as enzimas responsáveis são advindas das leveduras presentes no mosto.

Neste capítulo serão abordados o processo de produção da cerveja artesanal, as matérias-primas utilizadas na produção, o papel das enzimas em todas as fases, os aditivos permitidos pela legislação brasileira, além das tendências e inovações no setor cervejeiro.

2 | MERCADO CERVEJEIRO NO BRASIL

Atualmente, existe uma grande variedade na produção de cervejas, com diferentes formulações, sendo esta uma importante atividade econômica para diversos países.

O Brasil é o terceiro maior produtor de cerveja do mundo, atrás da China e dos Estados Unidos e deve alcançar, em 2023, o volume de vendas de 16,1 bilhões de litros, um crescimento de 4,5% em relação a 2022, de acordo com dados da empresa de mercado Euromonitor International, para o Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja (SINDICERV,2023) e possui uma cultura de consumo significativa entre os brasileiros.

O segmento da indústria cervejeira vem ganhando destaque acompanhado de um processo de crescimento do mercado das cervejarias artesanais. Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) o número de cervejarias artesanais passou de 114 no ano de 2010 para 1383 estabelecimentos registrados no ano de 2020.

No anuário de cerveja divulgada em 5 de julho de 2023 pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (Mapa) também houve um crescimento do setor cervejeiro de 11,6% em relação ao ano de 2022, com a abertura de 180 novos estabelecimentos em todo o país. Ao todo, o Brasil registra 1.729 cervejarias. Conforme mostra figura 1 baixo.

Gráfico 1: Total de estabelecimentos registrados

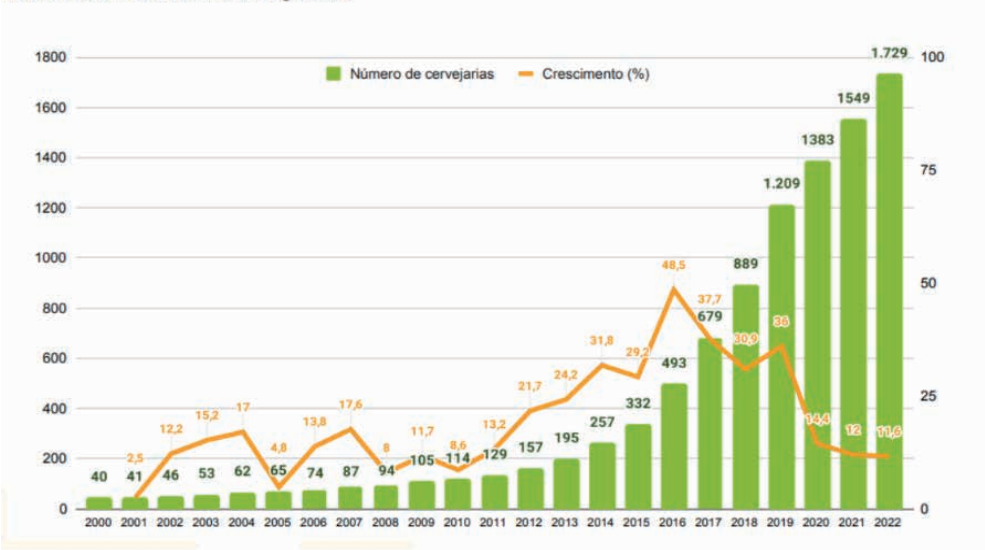


Figura 1. Representa o número de estabelecimentos desde 2000 até 2022 (MAPA, 2022).

3 | ETAPAS DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DA CERVEJA

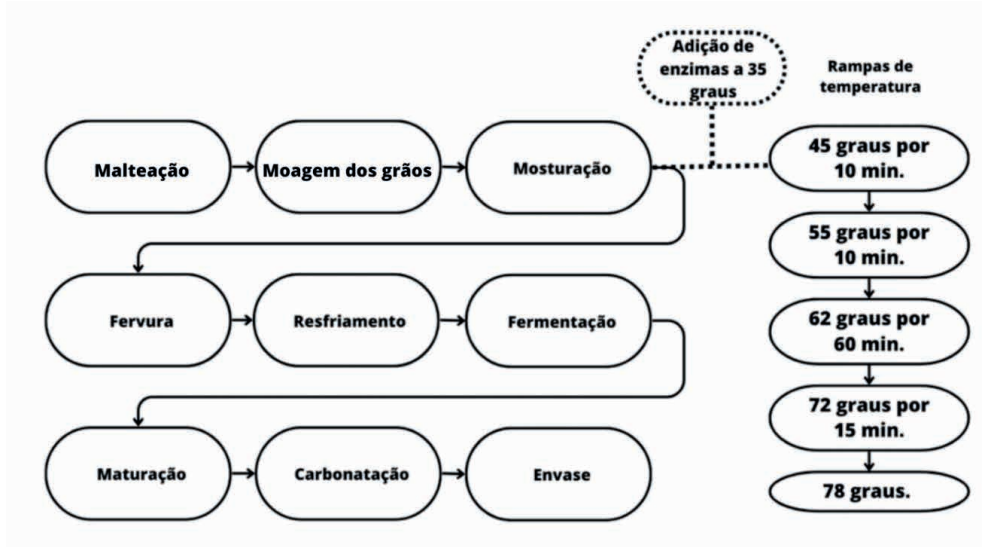


Figura 2. Fluxograma das etapas de processo cervejeiro

Fonte: Fluxograma elaborado por Rosa (2023).

3.1 Malteação

A malteação se trata da transformação dos grãos de cevada em malte, onde o objetivo é simular a germinação natural do grão no campo em um ambiente controlado para atingir maior produtividade. Nos primórdios, era feita de maneira rudimentar, por meio da germinação controlada dos grãos de cevada e secagem ao sol. Com o passar dos séculos, técnicas mais sofisticadas foram desenvolvidas para melhorar a eficiência e qualidade do malte, como por exemplo, o emprego de sistemas de aquecimento, como o forno de secagem, que permitiu um melhor controle da temperatura e do tempo de secagem, resultando em maltes mais consistentes e padronizados (STEINER, E. et al. 2011).

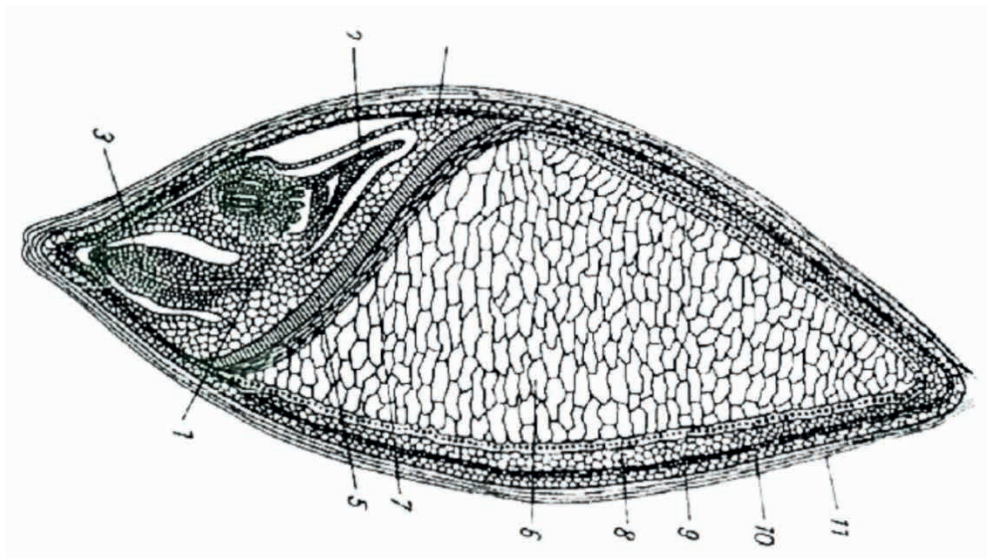


Figura 3. Corte vertical da cevada, mostrando as 3 principais partes do grão: edosperma, casca e embrião. (KUNZE, W. 2019).

Inicialmente a cevada é submergida em água para que absorva a umidade e ocorra sua germinação. Em seguida, se interrompe o crescimento das plântulas germinadas. Os grãos então são mantidos em condições controladas de temperatura e umidade para permitir o desenvolvimento das enzimas naturais presentes na cevada. Após esse processo, eles passam por uma máquina para retirada da radícula. No processo de secagem se confere diferentes características de sabor e cor ao malte, dependendo das condições e temperaturas de secagem utilizadas (HOUGH, J. 2013).

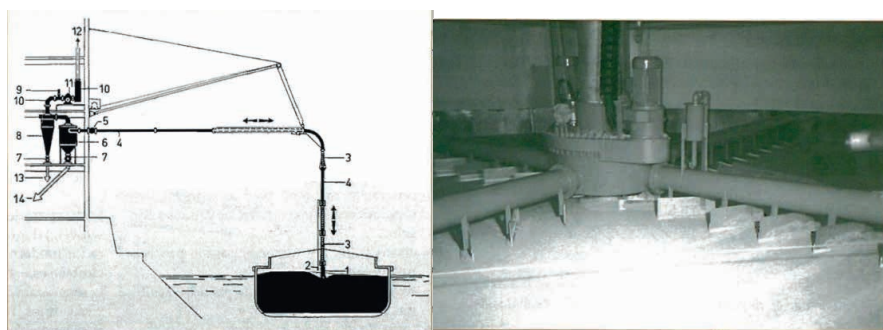


Figura 4 e 5. Estação de germinação da malteação. (KUNZE, W. 2019).

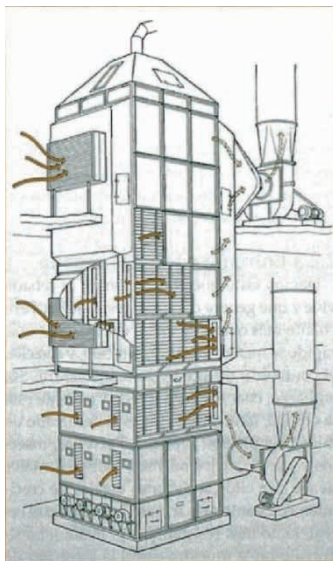


Figura 6. Estação de secagem da malteação. (KUNZE, W. 2019)

3.2 Moagem

O malte, produto da malteação é então moído em um moinho de rolos de maneira que se exponha o amido do endosperma, mas que se mantenham as cascas inteiras para auxiliar na clarificação (KUNZE, Wolfgang. 2019).

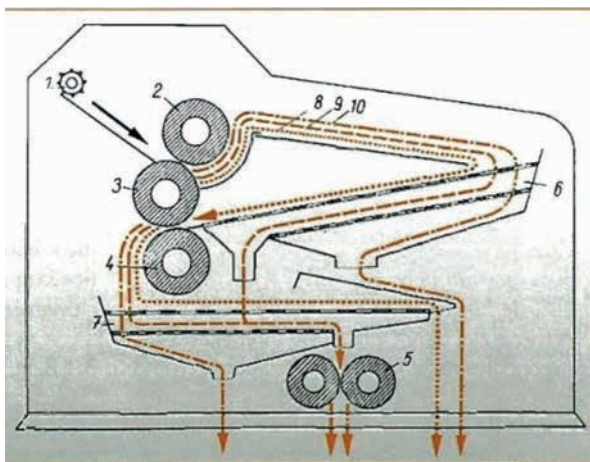


Figura 7. Moinho industrial de 5 rolos. (KUNZE, W. 2019).

3.3 Mosturação

O malte, já devidamente moído, é adicionado à tina de mostura junto com água

quente para iniciar o processo de mosturação. Segundo DANIELS, Ray. 1998, é durante a mosturação que as enzimas são então ativadas em etapas conhecidas como “Rampas de Temperatura”, que são temperaturas ótimas para ações de enzimas específicas, isso é feito para alcançar a melhor taxa de conversão dos amidos em açúcares fermentáveis. Os açúcares e proteínas extraídos do malte fornecem o substrato necessário para as leveduras durante o processo de fermentação, em que o açúcar é convertido em álcool e dióxido de carbono, resultando na cerveja final (TSCHOPE, E. 2001).

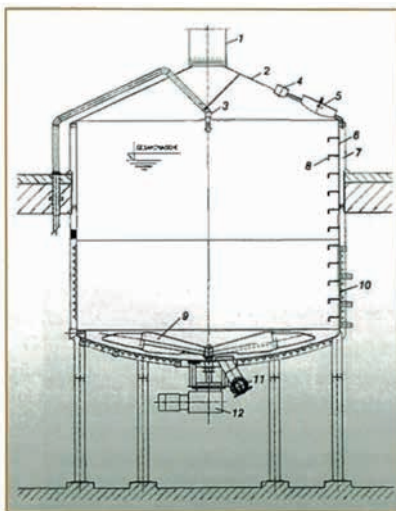


Figura 8. Tina de mosturação. (KUNZE, W. 2019).

3.4 Clarificação

Segundo REINOLD, M. 1997, etapa seguinte consiste na clarificação do mosto, líquido resultante da combinação de malte e água, e para a remoção de resíduos sólidos indesejados, como cascas de grãos e outros sedimentos é realizada em seguida a clarificação. Durante esse processo a ação enzimática realizada na mosturação desempenha um papel importante, pois se não bem realizada resulta em um mosto viscoso, que apresenta dificuldade para ser filtrado e clarificado. (KUNZE, Wolfgang. 2019).

3.5 Fervura e adição de lúpulo

Após a clarificação, o mosto é segurado para a tina de fervura. Nessa etapa, além da esterilização do mosto, se faz a adição de lúpulo, que confere aromas e sabores característicos da cerveja. Durante a fervura devido ao calor, algumas enzimas podem ser desnaturadas, perdendo sua atividade (MOSHER, R. 2018).

3.6 Resfriamento e fermentação

O mosto após fervido é resfriado rapidamente para uma temperatura adequada

para a adição de leveduras. As leveduras irão converter os açúcares fermentescíveis presentes no mosto que foram disponibilizados pelas enzimas na etapa de mosturação em álcool e dióxido de carbono. Embora as enzimas não sejam a principal reação, algumas leveduras podem produzir enzimas para a conversão de açúcares complexos em açúcares fermentescíveis durante esse processo, contribuindo para a eficiência e acaba gerando compostos aromáticos (MCCABE, J. T.; KHALSA, J.K. 1999).

3.7 Maturação e carbonatação

Após a fermentação, segundo LEWIS, M.; YOUNG, T. W. 2002, a cerveja para que se desenvolva aromática e gustativamente a cerveja passa por um período de maturação. Durante essa fase, as enzimas presentes na cerveja podem continuar a atuar em níveis reduzidos, contribuindo para a evolução do perfil sensorial. Em seguida, ocorre a carbonatação, em que o dióxido de carbono é injetado à cerveja para conferir a efervescência desejada.

3.8 Envase e armazenamento

Por fim, a cerveja é envasada em garrafas, latas ou barris e armazenada em condições adequadas.

Durante todo o processo de produção de cerveja, a atividade enzimática mostrou ser crucial ter uma eficiente fermentação, agindo na conversão dos componentes do malte em açúcares fermentescíveis, na quebra de proteínas, na redução de viscosidade e na formação de sabores e aromas complexos (POLLOCK, J.R.A. 1979).

4 | ENZIMAS CERVEJEIRAS

Enzimas são proteínas que têm como função acelerar reações metabólicas, reduzindo a quantidade de energia necessária para que elas ocorram e sua atividade é influenciada por alguns fatores como o pH, a temperatura do meio e o tempo de contato. Desempenham um papel fundamental na qualidade da cerveja, afetando características como teor alcoólico, corpo, clarificação e estabilidade da espuma. A aplicação de enzimas comerciais para a produção de cerveja se dá durante a mosturação como forma complementar ou substituir a atividade enzimática naturalmente presente no malte, que não era suficiente para realizar uma conversão satisfatória, assim os cervejeiros passaram a utilizar essas enzimas comerciais para se ter um maior controle, velocidade, limpidez e padronização do processo (GOMAA, A. M. 2018).

4.1 Enzimas na mosturação

Para a elaboração da cerveja, contamos com a participação de diversas enzimas desempenhando papéis fundamentais no processo de mosturação convertendo os

componentes do grão em açúcares fermentáveis, e afetando a qualidade e as características da cerveja final (POLLOCK, J.R.A. 1979). A seguir, serão descritas as principais enzimas utilizadas na produção de cerveja, bem como suas funções específicas durante o processo de mosturação:

α -amilase: responsável pela hidrólise do amido presente no grão de cevada em açúcares de maior peso molecular, como as dextrinas. Ela atua quebrando as ligações internas do amido, convertendo-o em açúcares que serão utilizados pelas leveduras, mas que trarão o dulçor e o corpo à cerveja. A α -amilase tem sua faixa ótima de ação nas temperaturas de 70°C a 75°C e tem maior atividade em pH ácido (MOTTA, J. F. G. et al. 2023).

β -amilase: também atua na quebra do amido, convertendo-o em açúcares fermentescíveis e impactam diretamente no teor alcoólico final da cerveja. No entanto, a β -amilase atua nas extremidades do amido, quebrando as ligações externas e liberando açúcares menores, como a maltose e a maltotriose. A β -amilase tem temperaturas ótimas mais baixas, na faixa de 60°C a 65°C, e tem maior atividade em pH neutro (Gomes, F. O. 2023).

Proteases: enzimas responsáveis pela quebra das proteínas presentes no grão de cevada. Durante o processo de mosturação, as proteases degradam as proteínas em aminoácidos, peptídeos e polipeptídeos menores. A atividade proteolítica é importante para a formação e estabilidade da espuma, atividade das leveduras, estabilidade da cerveja e desenvolvimento de sabores e aromas complexos (POLLOCK, J.R.A. 1979).

β -glucanase: atua na quebra de β -glucanos, um tipo de polissacarídeo presente na parede celular dos grãos. A atividade da β -glucanase é importante para evitar a formação de viscosidade excessiva durante o processo de mosturação, facilitando a filtragem e a clarificação do mosto (ZHANG, W. et al. 2023).

Hemicelulase: enzimas responsáveis pela quebra dos polissacarídeos presentes na parede celular do grão, como xilanas e arabinogalactanas. Essas enzimas atuam na degradação das hemiceluloses, facilitando a extração dos componentes do grão durante a mosturação (de SOUZA, T.S.P.; KAWAGUTI, H.Y. 2021).



Figura 9. Paredes de celulose dentro do grão (KUNZE, W. 2019).

Cada enzima tem uma faixa de temperatura e pH ótimos para sua atividade, e o controle adequado desses parâmetros é essencial para garantir a eficiência das enzimas e a obtenção dos resultados desejados.

4.2 Enzimas na fermentação

Já durante a fermentação, as enzimas dessa etapa não desempenham qualquer papel já que são desativadas no final desse processo (DE SCHEPPER, C. F. et al. 2022). No entanto, algumas enzimas podem estar presentes nas leveduras e continuar a converter açúcares complexos em açúcares fermentescíveis e liberar moléculas de aromas e sabores durante a fermentação, contribuindo para a eficiência e a produção de novos compostos.

A seguir iremos citar as principais enzimas produzidas pelas leveduras e ativas durante a fermentação:

Invertase – catalisa a hidrólise altamente exotérmica e irreversível da sacarose em glicose e frutose. Os cereais não apresentam moléculas de sacarose em sua composição, mas outros adjuntos utilizados comumente na cerveja como o açúcar de cana e beterraba, além do mel, apresentam e por isso se faz importante sua utilização (MANOOCHEHRI, H. et al. 2020).

β -glicosidade - enzima responsável pela biotransformação dos terpenos atuando em um glicosídeo (álcoois orgânicos, álcoois terpenos ou compostos carbônicos), liberando o terpeno aromático e uma molécula de glicose. Vale destacar que os terpenos têm forte característica sensorial. Essa enzima ela libera para o meio os precursores intermediários de aromas como o geraniol e o alfa-humuleno, que após outras biotransformações, se converterão em beta-citronelol, nerol, linalol e cariofileno que são terpenos bem aromáticos (SVEDLUND, N. et al. 2022).

Cisteina- β -liase – enzima responsável pela biotransformação dos tióis presentes em uma minúscula fração, menos de 1%, dos óleos essenciais do lúpulo sendo os mais comuns o 4MSP e 3MH. Eles se encontram em concentração muito baixa, porém são

potentes aromaticamente. Normalmente, são inativos, pois estão ligados a aminoácidos como a cisteína e por isso é necessário a utilização dessa enzima na forma exógena para sintetizar essa ligação (KOICHIRO KOIE et al. 2022).

Nessa etapa do processo, não há que se falar em pH e temperaturas ótimas dessas enzimas já que sua ação, apesar de importantes, são secundárias, sendo a fermentação a principal atividade e se alcançar.

5 | TENDÊNCIAS E INOVAÇÃO

A aplicação de enzimas comerciais durante a mosturação veio como forma complementar ou substitutiva a atividade enzimática naturalmente presente no malte, que não era o suficiente para realizar uma conversão satisfatória dos amidos (MAN, L. V. V.; NGUYET, T. N. M. 2005), assim os cervejeiros lançam mão dessas enzimas comerciais para se ter uma maior agilidade, controle e padronização do processo. Hoje, com avanços na seleção de variedades de cevada, métodos de armazenamento e técnicas de malteação, temos maltes de maior taxa enzimática endógena que no passado, conseguindo então realizar a conversão sem a necessidade da aplicação de enzimas exógenas (GUIDO, L. F.; FERREIRA, I. M. 2023).

Entretanto, quando se utiliza adjuntos não-maltados na mosturação ou na produção pelo método high gravity (PULIGUNDLA, P. et al. 2020), a carga enzimática presente nos maltes pode não ser o suficiente para realizar a conversão satisfatória dos amidos presentes no malte de cevada e nos adjuntos conjuntamente, além do fato que esses adjuntos podem ter um baixo teor de enzimas próprias. De acordo com Bogdan e Kordialik-Bogacka (2017) a baixa conversão pode acarretar em um impacto negativo na estabilidade da cerveja, resultando em uma cerveja defeituosa, com sabores desagradáveis e características sensoriais indesejadas. Para driblar este problema, nesses casos o emprego de preparos com enzimas comerciais se torna uma alternativa viável. Esses preparos enzimáticos comerciais contêm as enzimas beta-glucanase e hemicelulase (de SOUZA, T.S.P.; KAWAGUTI, H.Y. 2021).

Os principais adjuntos que podemos citar, são a cevada não malteada, milho, arroz, sorgo, trigo e tubérculos. Existe uma ampla gama de estilos de cervejas que em suas receitas são agregados adjuntos como a cervejas de Weissbier e Witbier (trigo) (REIS SELVATI COSTA, B. et al. 2020), Oatmeal Stout (aveia), American Standard Lager (milho e arroz) e cervejas sem glúten (sorgo) (GASIŃSKI, A. et al. 2023).

Os diferentes aportes sensoriais dados aos adjuntos permitem atender diversas demandas do mercado cervejeiro e seu emprego também pode ser atribuída à disponibilidade dessas matérias-primas regionais, conferindo tipicidade aos produtos e valorização da mão de obra local.

Além da busca por novos adjuntos, a parte enzimática também tem alto valor devido

à busca de novos aromas e sabores que sua utilização pode trazer para as cervejas. Nesse sentido, as enzimas cisteína-beta-liase e beta-glicosidase vem ganhando muito destaque nos últimos anos já que seus aromas frutados e florais agradam a uma parte considerável do público consumidor e abre porta para novos consumidores (TAKOI, K. et al. 2010).

Podemos concluir que sendo tendência à busca constante pela elaboração de novas receitas e a exploração de novos ingredientes, a utilização das enzimas comerciais ainda se fazem necessárias para a consolidação de novos estilos de cerveja.

6 | DESAFIOS

A cerveja artesanal tem ganhado cada vez mais popularidade no Brasil. No entanto, com seu crescimento também surgem alguns desafios para o setor. Abaixo estão elencados alguns dos principais desafios enfrentados pelas cervejarias artesanais no Brasil:

- **Carga Tributária:** A indústria de cerveja no Brasil é altamente regulamentada e possui uma carga tributária significativa. Isso pode ser especialmente difícil para as cervejarias artesanais, que geralmente operam em menor escala e possuem recursos financeiros limitados;
- **Concorrência com as Grandes Marcas:** As cervejarias artesanais competem com as grandes marcas de cerveja que têm uma presença estabelecida no mercado. A publicidade em larga escala das cervejarias comerciais torna difícil para as cervejarias artesanais alcançarem uma base de consumidores mais ampla;
- **Distribuição e Logística:** A distribuição de cervejas artesanais pode ser um desafio. As grandes cervejarias têm redes de distribuição consolidadas, enquanto as cervejarias artesanais podem enfrentar dificuldades para levar seus produtos a mercados mais distantes;
- **Capacidade de Produção Limitada:** Cervejarias artesanais geralmente têm capacidades de produção menores em comparação com as cervejarias comerciais. O aumento da demanda pode levar a problemas de escassez de produtos e a dificuldades em atender aos pedidos;
- **Qualidade e Consistência:** Manter a qualidade e a consistência do produto é um desafio para as cervejarias artesanais, especialmente quando há um crescimento rápido. Garantir que cada lote produzido tenha o mesmo padrão de qualidade pode ser complicado;
- **Educação do Consumidor:** Muitos consumidores ainda não estão familiarizados com o conceito de cervejas artesanais e podem não compreender as diferenças entre as cervejas industriais e as cervejas artesanais. A educação do consumidor é fundamental para aumentar o interesse e a demanda por cervejas artesanais;
- **Sazonalidade:** Algumas cervejas artesanais são produzidas sazonalmente, com

ingredientes específicos disponíveis apenas em determinadas épocas do ano. Isso pode levar a flutuações na oferta e na demanda;

- **Regulamentações e Normas:** As cervejarias artesanais estão sujeitas a regulamentações governamentais específicas relacionadas à produção e rotulagem de bebidas alcoólicas. O cumprimento dessas normas pode ser oneroso para as pequenas cervejarias;
- **Custos de Produção:** Ingredientes de alta qualidade podem ser caros, especialmente quando produzidos de forma sustentável. Além disso, aquisição de equipamentos especializados e tecnologia adequada também pode representar um investimento significativo.

Apesar dos desafios, a cerveja artesanal continua a crescer no Brasil devido ao aumento do interesse dos consumidores por produtos locais, de qualidade e com características distintas. As cervejarias artesanais têm conquistado espaço no mercado e contribuído para a diversificação e inovação da indústria cervejeira no país

7 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cerveja artesanal é uma tendência e tem ganhado cada vez mais espaço e reconhecimento no mundo. Esta bebida encontra-se na categoria de cervejas produzidas em menor escala, com ingredientes selecionados e um processo de fabricação mais cuidadoso e artesanal, resultando em produtos com sabores, aromas e característicos.

Contudo, é importante ressaltar que, como em qualquer indústria, também existem desafios na produção e comercialização da cerveja artesanal. Alguns dos principais obstáculos para produção dessa bebida no Brasil são: a concorrência acirrada, os altos custos de produção, a necessidade de educar o consumidor sobre os diferentes estilos de cerveja e a garantia de padrões de qualidade consistentes.

A cerveja artesanal representa uma tendência valiosa para o setor cervejeiro, trazendo uma experiência sensorial única, valorizando a cultura local, estimulando a inovação e promovendo um consumo mais consciente. Seja um apreciador ocasional ou um entusiasta de cervejas, a diversidade e a qualidade das cervejas artesanais oferecem uma experiência única.

REFERÊNCIAS

BOGDAN, P.; KORDIALIK-BOGACKA, E. **Alternatives to malt in brewing**. Trends in Food Science & Technology, v. 65, p. 1-9, 2017.

BRASIL. Instrução Normativa nº 65, de 10 de dezembro de 2019. **Estabelece os padrões de identidade e qualidade para os produtos de cervejaria**. Diário Oficial da União. Disponível em: <[https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa->](https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-)

CERVBRAIL – Associação Brasileira da Indústria da Cerveja. **A cerveja**. 2021. Disponível em: < http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/a-cerveja>

DANIELS, Ray. **Designing Great Beers: the ultimate guide to brewing classic beer styles**. Colorado: Brewers Publications, 1998.

DE SCHEPPER, C. F. et al. **A kinetic study on the thermal inactivation of barley malt α -amylase and β -amylase during the mashing process**. Food Research International, v. 157, p. 111201, 2022.

FLORES, R. G.; WATANABE, S. H. **Desenvolvimento de cerveja estilo witbier através do processo semi-industrial, controle de qualidade e análise sensorial**. R.E.V.I - Revista de Estudos Vale do Iguaçu, v. 1, n. 23, p. 27–48, 2014.

GASIŃSKI, A. et al. **Production of gluten-free beer brewing from sorghum malts mashed without external enzyme preparations**. v. 112, p. 103693–103693, 1 jul. 2023.

GOMAA, A. M. **Application of Enzymes in Brewing**. 26 jan. 2018.

Gomes, F. O. **Atividade Enzimática da Beta-Amilase em Cerveja Utilizando Diferentes Períodos de Repouso**. Ciência e Tecnologia de Alimentos: o Avanço da Ciência no Brasil, v.3, p.84-93, 31 mar. 2023.

GUIDO, L. F.; FERREIRA, I. M. **The Role of Malt on Beer Flavour Stability**. Fermentation, v. 9, n. 5, p. 464, 1 maio 2023.

HOUGH, J s et al. **Technology Brewing and Malting Volume 1: malt and sweet wort**. 2. ed. Nova York: Springer, 2013.

HOUGH, J s et al. **Technology Brewing and Malting Volume 2: Hopped Wort and Beer**. 2. ed. Nova York: Springer, 2013

KOICHIRO KOIE et al. **Development of a flavor hop (*Humulus lupulus* L.) cultivar, “Furano Magical”, with cones rich in 4-methyl-4-sulfonylpentan-2-one**. v. 102, n. 11, p. 4677–4684, 7 mar. 2022.

KUNZE, Wolfgang. **Technology Brewing and Malting**. 6. ed. Berlin: Vlb, 2019.

LEMOS, E.H. **Automação de um processo de malteação**. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Automação Industrial). 55f. 2017. Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais. Araxá, MG. 2017.

LEWIS, Michael; YOUNG, Tom W. **Brewing**. 2. ed. Nova York: Springer, 2002.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Anuário da Cerveja 2023**. Brasília - DF. 2023.

MCCABE, John T.; KHALSA, Japa Kaur. **The Practical Brewer**. 3. ed. Londres: Amer Assn of Cereal Chemists, 1999.

MALLET, John. **Malt: A Practical Guide from Field to Brewhouse**. Colorado: Brewers Publications, 2014.

MAN, L. V. V.; NGUYET, T. N. M. **Effect of utilization of microbial enzyme complex in mashing process from malt and sweet potato**. VNUHCM Journal of Science and Technology Development, v. 8, n. 10, p. 35–41, 31 out. 2005.

MANOOCHEHRI, H. et al. **A review on invertase: Its potentials and applications**. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 25, p. 101599, maio 2020.

MARCUSSO, E. F. **AS MICROCERVEJARIAS NO BRASIL ATUAL: Sustentabilidade e Territorialidade**. SOROCABA-SP: Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade na Gestão Ambiental - UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS 171 p. 2015.

MOSHER, Randy. **Radical Brewing: receitas, contos e ideias transformadoras em um copo de cerveja**. Porto Alegre: Krater, 2018.

MOTTA, J. F. G. et al. **Use of enzymes in the food industry: a review**. Food Science and Technology, v. 43, p. e106222, 27 mar. 2023.

OKOLO, B. N. et al. **Influence of malted barley and exogenous enzymes on the glucose/maltose balance of worts with sorghum or barley as an adjunct**. Journal of the Institute of Brewing, v. 126, n. 1, p. 46–52, 2020.

POLLOCK, J.R.A. **Brewing Science vol1**. Londres: Academic Press, 1979.

POLLOCK, J.R.A. **Brewing Science vol2**. Londres: Academic Press, 1979.

PULIGUNDLA, P. et al. **Recent developments in high gravity beer-brewing**. Innovative Food Science & Emerging Technologies, v. 64, p. 102399, ago. 2020.

REINOLD, Matthias R. **Manual Prático de Cervejaria**. São Paulo: Aden, 1997.

REIS SELVATI COSTA, B. et al. **Desenvolvimento de cerveja no estilo witbier adicionada de gengibre (*Zingiber officinalis*) e sua influência na fermentação**. Revista Eletrônica TECCEN, v. 13, n. 2, p. 52–56, 23 dez. 2020.

de SOUZA, T.S.P.; KAWAGUTI, H.Y. **Cellulases, Hemicellulases, and Pectinases: Applications in the Food and Beverage Industry**. Food Bioprocess Technol, v. 14, p. 1446-1477, 2021.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DA CERVEJA – SINDICERV. **A cerveja**, 2007. Disponível em <<http://www.sindicerv.com.br>>. Acesso em 01/07/2023

STEINER, E. et al. **Comparison of beer quality attributes between beers brewed with 100% barley malt and 100% barley raw material**. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 92, n. 4, p. 803–813, 3 out. 2011.

SVEDLUND, N. et al. **Fruits of their labour: biotransformation reactions of yeasts during brewery fermentation**. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 106, n. 13-16, p. 4929–4944, 19 jul. 2022.

TAKOI, K. et al. **The Contribution of Geraniol Metabolism to the Citrus Flavour of Beer: Synergy of Geraniol and β -Citronellol Under Coexistence with Excess Linalool.** Journal of the Institute of Brewing, v. 116, n. 3, p. 251–260, 2010.

TSCHOPE, Egon Carlos. **MICROCERVEJARIAS E CERVEJARIAS.** Betim: Aden, 2001.

ZHANG, W. et al. **More efficient barley malting under catalyst: Thermostability improvement of a β -1,3-1,4-glucanase through surface charge engineering with higher activity.** Enzyme and Microbial Technology, v. 162, p. 110151, 1 jan. 2023.

ADAPTATION AND CONTINUOUS CULTIVATION OF MICROORGANISMS USED IN THE BIOLEACHING OF SULPHIDE MINERALS: A BIOTECHNOLOGICAL APPROACH

Data de aceite: 02/10/2023

Luis Gonzaga Santos Sobral

CETEM- Centro de Tecnologia Mineral

Andriela Dutra Norberto de Oliveira

CETEM- Centro de Tecnologia Mineral

Amandha Gomes Tavares de Miranda

CETEM- Centro de Tecnologia Mineral

Naiara Soares Bello

CETEM- Centro de Tecnologia Mineral

Armando Lucas Cherem da Cunha

Escola de Química da UFRJ

ABSTRACT: The processes of Bioleaching of sulphide minerals, aiming at extracting the metallic values from these mineral species, as well as the bio-oxidation of these sulphides so as to release gold particles encapsulated in these mineral matrices for further extracting the remaining gold, require, at first, a stage of adaptation of the involved microorganisms to the growing ionic strengths, due to these bio-oxidative processes, followed by the continuous cultivation of these microorganisms in order to use them in the aforementioned extractive processes at the appropriate production scales. Therefore, this

technological contribution aims at defining the conditions, in the first place, for adapting those microorganisms to increasing ionic strengths and for their continuous cultivation, considering the bio-oxidative processes in which such cultures will be used.

KEYWORDS: bioleaching, bio-oxidation, microorganisms, sulphide minerals.

1 | INTRODUCTION

Bioleaching can be defined as a dissolution process of sulphide minerals that results from the action of a group of microorganisms (PRADHAN et al., 2008). Ferric ions (*i.e.*, Fe^{3+}), generated by microbial action, oxidize the sulphide minerals with consequent release of the constituent metals in their ionic forms, generating the leachate from which they will later be recovered according to their physicochemical characteristics. In this case, the main function of microorganisms is to regenerate Fe^{3+} ions. This process has advantages such as low cost, friendly to the environment and adequate in the treatment of ores with low levels of metals of economic

interest. It is a bioprocess widely recognized as an interesting route from an economic and environmental point of view, since it requires little expenditure on consumables (*i.e.*, acids and oxidizing agents), which are produced by the microorganisms themselves, reduced energy expenditure, low capital investment, low operating costs, reduced skilled labour in the operation compared to other metal extraction processes, use of ore tailings with reduced contents of metals of interest, in addition to not issuing SO₂, as in the pyrometallurgical process. Therefore, bioleaching can also be an alternative for small-sized deposits and/or far from centres with the necessary infrastructure.

Bioleaching is a biotechnological process that is based on the use of natural microorganisms capable of solubilizing sulphide minerals resulting in the release of constituent metals (GARCIA, 2007). Generally, these microorganisms involved in the natural processes of bioleaching in mining have well-defined characteristics. They preferentially grow in acidic environments (*i.e.*, they are acidophilic), and can even grow at pH close to zero (OTTOBONI & SATO, 2000), and such processes occur through the action of bacteria such as *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*, and *Acidithiobacillus thiooxidans* etc. (BRIERLEY, 2010; RODRIGUES, 2015; TAO & DONGWEI, 2014; WATLING, 2006). According to Oliveira (2009), due to physiological and environmental similarities, these bacteria coexist simultaneously, intensifying the solubilization of the constituent metals of sulphide minerals, and are classified as chemoautotrophic, since they obtain energy from the oxidation of inorganic compounds such as sulphides (ALMEIDA, 2005; SILVAS, 2010), using CO₂ as the only carbon source for biomass production and are classified according to the temperature at which they develop, distinguishing themselves into: mesophiles (up to ~40 °C), moderate thermophiles (~40 - ~55 °C) and extreme thermophiles (~55 ~80 °C) (CHANG et al., 2000; NAGPAL et al., 2000).

The bioleaching of metals has been applied on an industrial scale, especially for copper, through static leaching in heaps. However, for metals with high added value, such as, for example, gold, the operating system used is tanks under agitation. Regardless of the system, the use of bacterial *inocula* is increasingly being understood as an optimization of the process, either in heaps or in reactors.

Thus, the production of large volumes of inoculum presents itself as a new challenge for the process. Generally speaking, this production can be obtained by a batch system or by the continuous cultivation of the microorganisms to be used. The continuous system can produce, in an accelerated way, substantial amounts of the different microbial consortia for an inoculation operation of bioleaching heaps on an industrial scale, for the extraction of the metals of interest from the sulphide minerals bearing these elements.

However, bioleaching is a biological process and, therefore, several factors affect the growth and activity of the microorganisms used in the process, including bacterial strains, pH, Eh, temperature and heavy metals in the leachates (YAMANE, 2012; KIM et al., 2021). During bioleaching processes, bacterial viability can be especially affected by increasing the

ionic strength in solution, resulting in decreased recovery of available elements in sulphide minerals (KIM et al., 2021), since microorganisms are aerobic, *i.e.*, need oxygen for their survival. With increasing salinity, the solubility of a gas is reduced, which makes it difficult for microorganisms to access oxygen. Therefore, bacterial adaptation to heavy metals could play a significant role for increasing bioleaching efficiency.

Thus, this work aimed at investigating the process of continuous cultivation of adapted acidophilic microorganisms, more specifically consortia of mesophilic iron oxidizing microorganisms, which are used in bioleaching of sulphide minerals.

2 | EXPERIMENTAL

2.1 Adaptation of microorganisms

Tests for adapting the microorganisms to increasing ionic strength, involving a consortium of *A. ferrooxidans*, LR strain, and *L. ferrooxidans* (ATCC53992), using an aliquot of 10 mL of the culture of *A. ferrooxidans* and 10 mL of *L. ferrooxidans*. The tests were accomplished in duplicate and included a negative control, in which no microorganisms were added (Control), only 200 mL of deionized H₂O acidified to pH 1.8 with 5M H₂SO₄ and 0.5g/L of ore. Using 500mL Erlenmeyer flasks, initially an aliquot was taken from the culture carried out in fresh medium and transferred to a new medium containing 0.5g/L of gold ore (*i.e.*, bearing chalcopyrite, pyrite and galena) and 32.16g/L of FeSO₄ (*i.e.*, ferrous sulphate, source of energy for the microorganisms), together with MKM culture medium (*i.e.*, 0.4 g.L⁻¹ of ammonium sulphate; 0.4 g.L⁻¹ of heptahydrate magnesium sulphate and 0.04 g.L⁻¹ of monopotassium phosphate). The Erlenmeyer flasks were placed in an orbital shaker (Eppendorf Innova S44i) at 30°C and under orbital agitation of 150 rpm, for a period of 3 days. In each new subculture, 10% v/v of inoculum from the previous culture was added to the fresh medium, in a solid/liquid ratio higher than that of the previous culture, being inversely proportional to the FeSO₄ concentrations, that is, as the ore concentration increased, the concentration of ferrous sulphate decreased, considering that the added ore contains sulphide minerals that are responsible for supplying such demand during their oxidative biological transformations.

During 28 days of adaptation, cell viability tests were performed to verify the growth of the bacterial population. An aliquot of the subculture, containing ore, was removed and placed in a fresh medium, under ideal growth conditions, being conditioned in the Eppendorf Innova S44i shaker for another 3 to 5 days. Another way of observing growth was through cell counting using an optical microscope coupled to a Thoma's chamber. A new propagation was performed when the count reached at least 10⁷ cells per millilitre of culture. The technique of spectrophotometric analysis was used to determine the concentrations of Fe²⁺ and total iron in the samples undergoing the adaptation process. The spectrophotometer (HACH DR 6000) was set to a wavelength of 510 nm, suitable for the analysis of Fe²⁺ and

total iron. The samples were analysed in duplicate, that is, two aliquots of each sample were evaluated for Fe^{2+} and two aliquots for total Iron, in order to guarantee the precision and reproducibility of the results obtained.

The initial pH was recorded daily and, when necessary, adjusted with H_2SO_4 (5M), also recording the final pH. The number of drops of H_2SO_4 (5M) used to adjust the pH in each Erlenmeyer flask was recorded in order to assess acid consumption. The ore concentration was gradually increased at each propagation, starting with 0.1% of the total desired volume and reaching a solid-liquid ratio of 10% w/v.

2.2 Continuous cultivation

From the adaptation of the microorganisms, the microbial cultivation process was carried out through a continuous feeding of “new” MKM culture medium, in which the reaction volume (20L) was kept constant through the continuous removal, by overflow, of the “old” medium used.

The continuous cultivation process (Figure 1) began discontinuously, in which the reactor with MKM culture medium and solids (*i.e.*, 1 g.L^{-1} of the gold ore produced by Euro Metal, the gold mining sponsor of this study), was inoculated with consortia of mesophilic microorganisms *A. ferrooxidans*, LR strain, and *L. ferrooxidans* (ATCC53992) in a 20L reactor useful volume. After a period of discontinuous operation, in which the culture reached a high cell population density, in the order of 10^7 cells/mL, the reactor was fed with culture medium and consequent spill over of the medium as a whole, containing the microorganisms of interest, initiating, effectively, the continuous process.

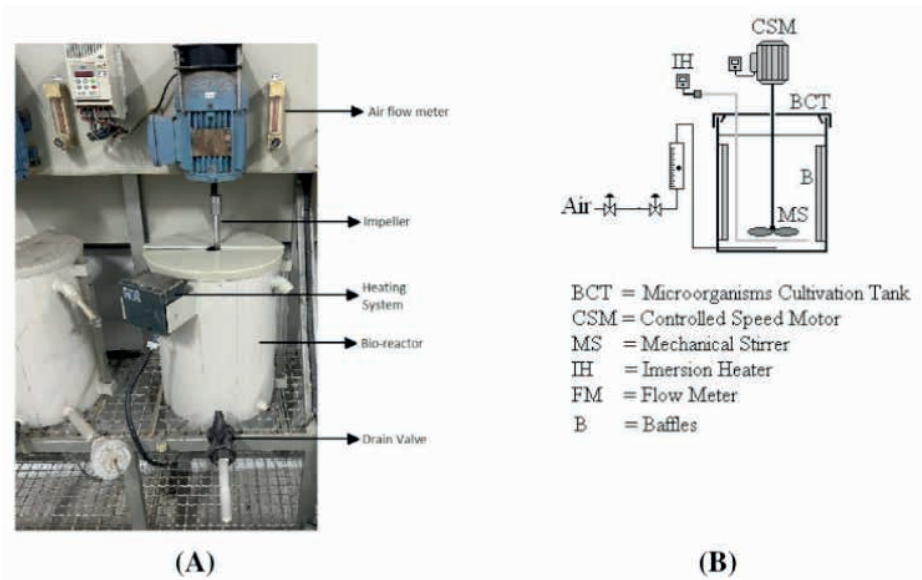


Figure 1- Continuous microorganism cultivation system, where Figure (A) shows the reaction system used and in Figure (B) the details of this reaction system.

The vertical stirrer is equipped with metal pallets, made of 316L stainless steel, and positioned in the centre of the reactor, as shown in Figure 2. This stirrer rotated at speeds ranging from 160 to 180 rpm. Air was injected into the lower part of the reactor and below the pallets fixed to the stirrer shaft at a flow rate of 10 to 15 L/h. Temperature control was carried out through a resistance located inside the tank.



Figure 2 - Interior of the microorganism culture tank.

The reactors were kept with 0.1% w/v of solid (*i.e.*, gold ore) and gases (*i.e.*, O₂ and CO₂) at the aforementioned flow rate. The temperature of the cultures, the inlet flows of MKM (*i.e.*, nutrient solution), the solid addition (*i.e.*, gold ore), and the retention times of the microorganisms in the reactor, that is, the time elapsed for renewing the reactor cultivation volume, are described in Table 1.

Mesophilic Microorganisms			
Variables			
Temperature/ °C	30		
Retention Time/days	5	3	1
MKM Flow Rate/(L.day ⁻¹)	3.4	5.67	17
Solids Addition/(g.day ⁻¹)	68	113,3	340

Table 1- Conditions used during continuous cultivation of microorganisms.

Figure 3 shows the daily feed rates of nutrients and solids during the period of continuous cultivation of mesophilic microorganisms. Due to the need for less time for the growth of the microorganisms that constitute the mesophilic consortium, it was possible to carry out the test in two stages with different retention times.

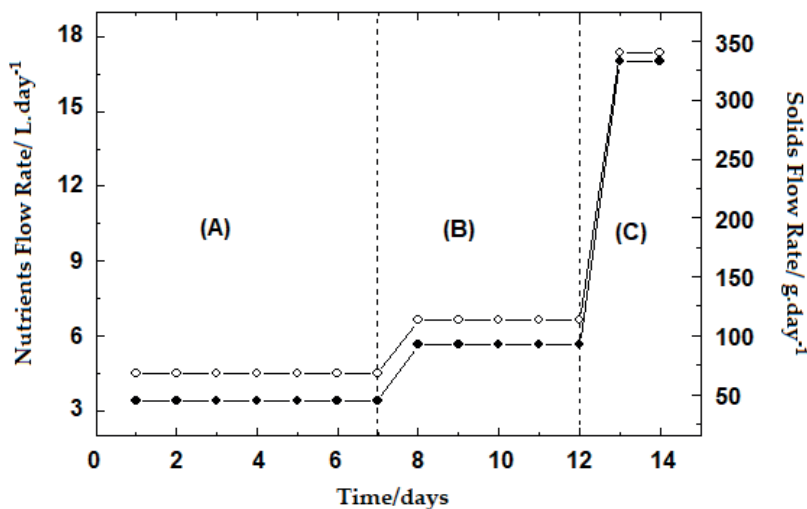


Figure 3 - Profile of the continuous production of Mesophilic Microorganisms, over a period of 14 days. The solid symbols (●) represent the Nutrient Feed and the empty symbols (○) the Solids, obtaining the following retention times (A) 5 days; (B) 3 days and (C) 1 day.

2.3 Concentration of ionic iron species

For determining the concentration of ionic iron species in the microbial inoculum, analyses of Fe^{3+} and Fe^{2+} concentrations were carried out using a spectrophotometric method with the use of orthophenanthroline. To quantify the Fe^{2+} concentration, the diluted sample was mixed with orthophenanthroline and the pH adjusted with acidic water at pH 2.1. After the formation of the Fe^{2+} /orthophenanthroline complex, the absorbance was measured at 510 nm. For total iron determination, Fe^{3+} ions were reduced to Fe^{2+} using hydroxylamine. The Fe^{3+} concentration was obtained by the difference between total iron and Fe^{2+} concentrations.

2.4 pH and Eh Monitoring

The pH and Redox Potential were monitored during the tests with an Analion pH-meter AN2000 Microprocessed device, using a pH combined glass electrode and Pt electrode (*i.e.*, with Ag^0/AgCl reference), respectively. The electrodes were previously sterilized (*i.e.*, 20 minutes of immersion in 5% v/v formaldehyde solution (HCOH)) to avoid contamination of the culture.

2.5 Microbial Concentration

Microbial quantification was accomplished using a Thoma chamber with the following dimensions: area of 0.0025 mm^2 and depth of 0.100 mm , equipped with quadrangular divisions. Thus, counting the four quadrants of the extremities was adopted as a methodology. After counting, the equation below was used to determine the value corresponding to the

number of microorganisms per mL of the analysed suspension, remembering to add the dilution factor to the calculation, should this have been done.

$$M^{os}/mL = average \frac{16.10^5}{6.4}$$

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Adaptation

Figure 4 shows the variation of the redox potential throughout the bioprocess. It can be observed that the potential gradually increases, indicating the evolution of the oxidative process, with a consequent increase in the total iron concentration due to the oxidation of sulphide minerals bearing iron in their structures, that is, pyrite (FeS₂), pyrrhotite (Fe_(1-x)S) and chalcopyrite (CuFeS₂). As expected, the fluctuations in the concentrations of the ionic iron species cause the variation of the redox potential throughout the experiment.

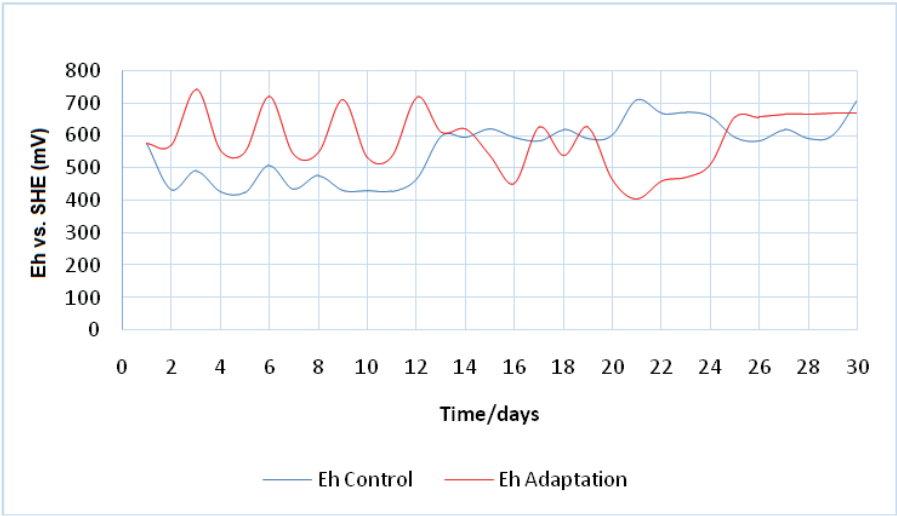


Figure 4 - Eh variation throughout the test period.

An increase in pH was observed in the first two days of the test; however, this parameter did not reach a value higher than 3 (Figure 5). This increase in pH is directly related to the reaction of sulphuric acid with the mineralogical species that make up the ore's gangue, which readily react with the available acid. The addition of sulphuric acid was carried out in the first four days, adding the equivalent of 39 kilograms of acid per ton of ore.

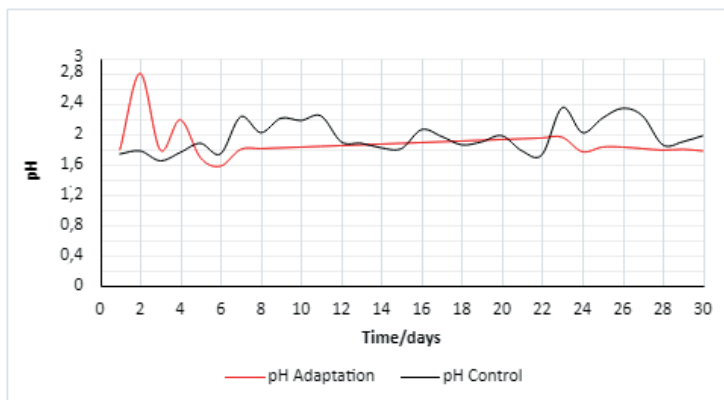


Figure5- pH variation throughout the test period.

3.2 Continuous cultivation

It was observed that in the cultivation of Mesophilic Microorganisms, with longer process time (Figure 6), the values of redox potential decrease, taking into consideration the concentrations of iron species (*i.e.*, Fe^{2+} and Fe^{3+}) in solution, according to the Nernst equation (*i.e.*, E_h a $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{Fe}^{2+}]$) (Figure 7) and microbial population density increases. However, both presented a satisfactory microbial population, that is, values higher than 10^7 cells/mL.

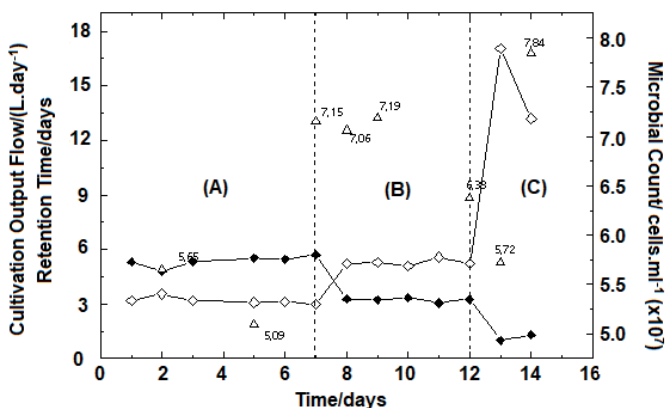


Figure 6- Culture outflow (◇), retention time (◆) and microbial count (Δ) of Mesophilic Microorganisms, with the increase in nutrient flow: (A) 3.4 L/day; (B) 5.67 L/day and (C) 17.0 L/day.

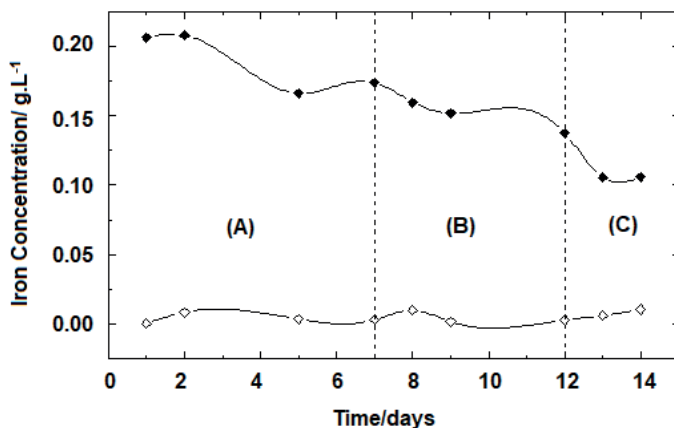


Figure 7- Variations in the Fe^{2+} concentration ($\diamond$) and Fe^{3+} ($\blacklozenge$), in the continuous growth of Mesophilic Microorganisms, as the flow of nutrients increases: (A) 3.4 L/day; (B) 5.67 L/day and (C) 17.0 L/day.

The low values of redox potential in the test, in a shorter period of time (around 0.600 V vs. SHE), Figure 8, may be directly related to the duration of the test, causing an increase in the flow of culture medium solution, in shorter time.

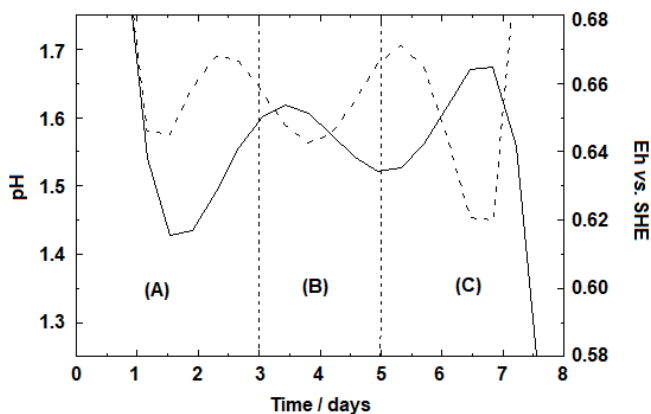


Figure 8- Variations of pH (—) and Redox Potential (---), in the continuous cultivation of Mesophilic Microorganisms, as the nutrient flow increases: (A) 3.4 L/day; (B) 5.67 L/day and (C) 17.0 L/day.

Observing the Figure 9, it is possible to notice that during the first four days of the experiment, there were small variations in the concentrations of Fe^{2+} and Fe^{3+} ions. However, from the 4th day onward, it is evident that the variation of these concentrations was quite expressive. There was a considerable increase in the concentration of Fe^{3+} , while the concentration of Fe^{2+} decreased, that is, the concentration of Fe^{2+} was inversely proportional to the concentrations of Fe^{3+} . It is possible that the demand for ferrous ions by microorganisms has increased, leading to an increase in the concentration of Fe^{3+} in solution. The decrease in Fe^{3+} , from the fifth day onward, may be linked to its reduction to

Fe^{2+} by the indirect mechanism of sulphide minerals oxidation. Additionally, the increase in Fe^{2+} concentration may have caused greater microbial growth, because Fe^{2+} becomes an energy source for the microorganisms metabolic processes; however, the increase in the concentration of ferrous ions and the reduction in the concentration of ferric ions may also be related to the cell concentration, that is, it is possible that there is not enough microorganism to oxidize these ferrous to ferric ions, so that these ions could oxidize the sulphide minerals present and, with that, solubilize the metal of interest, reducing it, consequently, to its respective ferrous ions. On the other hand, the reduction in the concentration of Fe^{3+} may be related to a possible decrease in the availability of the mineral substrate, that is, the sulphide minerals that are responsible for providing energy sources, Fe^{2+} in particular. This means that it is necessary, in order to make continuous cultivation possible, to feed the nutrient solution containing, in a mechanical suspension, some mineral substrate.

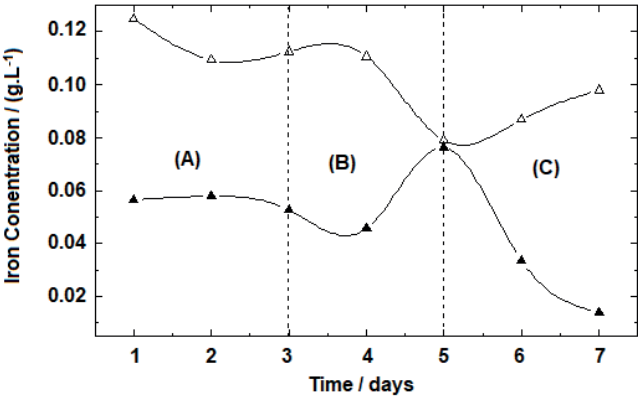


Figure 9- Variations in the concentration of Fe^{2+} (Δ) and Fe^{3+} (▲), in the continuous growth of Mesophilic Microorganisms, as the flow of nutrients increases: (A) 3.4 L/day; (B) 5.67 L/day and (C) 17.0 L/day.

The purpose of using the continuous microbial inoculum production process was to produce, in an optimized way and in less time, a greater volume of inoculum. Thus, the Table below shows, with respect to time, the volume produced in the different processes:

Consortium	Duration of Test (Days)	Time for Optimum Growth (Days)	Continuous Process (Volume/L)	Discontinuous Process (Volume/L)
Mesophilic	6	3	55.54	30

Table 2 - Production of microbial inoculum in continuous and batch systems.

4 | CONCLUSION

The adaptation process occurred as expected, since there was an evolution of the oxidative process;

It is possible to observe that cultivation in a continuous process proved to be effective in terms of inoculum production, considering the microbial population density values presented in this study (*i.e.*, at least 10^7 cells/ml), provided that the adaptation of microorganisms to increasing ionic strength is previously carried out;

The present study proved that it is possible to cultivate acidophilic iron-oxidizing microorganisms in a continuous system, maintaining a microbial density higher than 10^7 cells/mL, which is so necessary for the bioleaching process;

The addition of ore, bearing pyrite, was efficient in controlling the pH, causing it to decrease from 2.2 to 1.9 in 4 days;

Evaluating Table 2, it can be concluded that cultivation in a continuous system proved to be more efficient in the production of microbial inoculum, in particular, the production of consortiums of mesophilic microorganisms.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, S. K. Detecção de bactérias redutoras de sulfato em efluente e sedimento de mina de urânio. 2005. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais) – Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Belo Horizonte, 2005.

BRIERLEY, CL. **Biohydrometallurgical prospects**. Hydrometallurgy 2010; v.104, p.324-8.

GARCIA Jr., O. Estudos da biolixiviação de minérios de urânio por *Thiobacillus ferrooxidans*. 1989. 37 f. Tese (Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Genética), Universidade de Campinas, Campinas, 1989.

KIM, B; KOH, Y.-K.; KWON, J.-S. Bioleaching of Pyrrhotite with Bacterial Adaptation and Biological Oxidation for Iron Recovery. Metals 2021, 11, 295. <https://doi.org/10.3390/met11020295>.

NAGPAL, S. et al. Ethanol utilization by sulfate-reducing bacteria: an experimental and Modeling study. Biotechnology and Bioengineering, London, v. 70, n. 5, p. 533-543, Dez. 2000. P

TAO, H; DONGWEI, L. **Presentation on Mechanisms and Applications of Chalcopyrite and Pyrite Bioleaching in biohydrometallurgy-A Presentation**. Biotechnology Reports 2014.

WATLING, H.R. **The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides—A review**. Hydrometallurgy, v.84, p.81-108, 2006.

OTTOBONI, L. M. M.; SATO, M. I. Z. Bactérias de Interesse Ambiental e Agroindustrial. Sub Projeto 1: Diversidade Molecular de *Thiobacillus* em Ambientes Antrópicos.

PRADHAN, N.; NATHSARMA, K.C.; S.RAO, K.; SUKLA, L.B., MISHRA, B.K Heap bioleaching of chalcopyrite: A review. Minerals Engineering, v. 21, p. 355-365, 2008.

RODRIGUES, MLM. Biolixiviação de cobre com Micro-organismos Mesófilos e Termófilos Moderados: Sulfetos Secundários Contendo Flúor e Placas de Circuito Impresso. REDEMAT, ufop, 2015. 116p.

YAMANE, Luciana Harue. Recuperação de metais de placas de circuito impresso de computadores obsoletos através de processo biohidrometalúrgico. 2012 p. 19. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

CLÉCIO DANILO DIAS DA SILVA - Doutor em Sistemática e Evolução pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Mestre em Ensino de Ciências Naturais e Matemática pela UFRN. Especialista em Ensino de Ciências Naturais e Matemática pelo Instituto Federal do Rio Grande do Norte (IFRN). Especialista em Educação Ambiental e Geografia do Semiárido pelo IFRN. Especialista em Gestão Ambiental pelo IFRN. Licenciado em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Facex (UNIFACEX). Licenciado em Pedagogia pelo Centro Universitário Internacional (UNINTER). Docente dos componentes curriculares Ciências e Biologia pela Secretaria de Estado da Educação, da Cultura, do Esporte e do Lazer (SEEC-RN). Atualmente está vinculado Laboratório de Collembola (COLLEMBOLAB) do Departamento de Botânica e Zoologia do Centro de Biociências (DBEZ-CB) da UFRN. Tem experiência em Zoologia de Invertebrados, Ecologia aplicada; Educação em Ciências e Educação Ambiental. Áreas de interesse: Fauna Edáfica; Taxonomia e Ecologia de Collembola; Ensino de Ciências; Ensino de Biodiversidade e Educação para Sustentabilidade.

DANIELE BEZERRA DOS SANTOS - Doutora em Psicobiologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Mestre em Bioecologia Aquática pela UFRN. Graduada em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Facex (UNIFACEX). No âmbito profissional e de gestão acadêmica e administrativa, coordenou a Pesquisa e Extensão do UNIFACEX. Coordenou os cursos de Pós-Graduação Especialização em Meio Ambiente e Gestão de Recursos Naturais (UNIFACEX) e da Especialização em Microbiologia e Parasitologia (UNIFACEX). Também coordenou o curso de graduação Licenciatura em Ciências Biológicas do UNIFACEX. Na esfera pública federal, coordenou o curso de Especialização em Ensino de Ciências Naturais e Matemática do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte (IFRN). Atualmente, é professora do Curso de Pós-Graduação Especialização em Ensino de Ciências Naturais e Matemática do IFRN e atual como Coordenadora da Pesquisa e Inovação do Campus Pau dos Ferros (COPEIN-PF/IFRN). Áreas de interesse: Ensino; Meio Ambiente; Comportamento Animal.

A

Agricultura 40, 49, 59, 63, 74

Antígeno 12, 15, 16, 18, 19

Aplicação enzimática 2

B

Bacteriocinas 51, 52, 53, 59

Bioativos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11

Biossegurança 48, 51, 52

Biossensores 48, 50, 53, 55, 56, 57, 58, 59

Biotecnologia 8, 9, 48, 49, 59

C

Catalisador biológico 2

Celulases 4, 7, 9

Cerveja artesanal 60, 61, 62, 72, 73

Coronavírus 12, 13, 14, 19, 20, 21

Covid-19 12, 13, 15, 16, 19, 20, 21

Cromomicose 41, 42, 44, 46, 47

D

Diagnóstico 12, 21

Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar 50

E

Embalagens inteligentes 53, 55, 56

Enzima 2, 3, 4, 5, 6, 16, 48, 50, 55, 56, 57, 58, 70

Enzimas comerciais 61, 62, 68, 71, 72

Equinos 22, 23, 24, 25, 27, 29

F

Fermentação 62, 67, 68, 70, 71, 75

Fungos geofílicos 42

H

Helmintos 28, 29, 32, 33, 38

I

Indústria 1, 3, 6, 48, 49, 53, 54, 56, 57, 60, 61, 63, 72, 73, 75

L

Lesões nodulosas 42

Levedura 60, 62

Lúpulo 60, 62, 67, 70

M

Malteação 60, 62, 64, 65, 66, 71, 74

Moagem 66

Mosturação 61, 62, 66, 67, 68, 69, 71

O

Óleo ozonizado 23, 27, 29, 32, 35, 37, 38, 39

Organismos vivos 2

Ozonioterapia 24, 32, 33, 38

P

Parasitas 23, 24, 25, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 40

Pectinases 4, 7, 10, 11, 75

Pecuária 49, 63, 74

Processo de produção 60, 61, 62, 64, 68

Proteases 4, 7, 9, 69

S

Saúde 8, 13, 14, 17, 19, 20, 24, 42, 47, 49, 50

Superfície 12, 14, 18, 45, 50

T

Tecnologia emergente 1, 2

V

Verminoses 22, 23

Vírus 12, 13, 14, 18, 24, 33

As ciências biológicas e os progressos que beneficiam a sociedade 2



www.atenaeditora.com.br



contato@atenaeditora.com.br



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



www.facebook.com/atenaeditora.com.br

As ciências biológicas e os progressos que beneficiam a sociedade 2



www.atenaeditora.com.br



contato@atenaeditora.com.br



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



www.facebook.com/atenaeditora.com.br