



TÓPICOS EM MICROBIOLOGIA

Frederico Celestino Barbosa

Tópicos em microbiologia

1ª ed.

Piracanjuba-GO
Editora Conhecimento Livre
Piracanjuba-GO

1ª ed.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Barbosa, Frederico Celestino
B238T Tópicos em microbiologia

/ Frederico Celestino Barbosa. – Piracanjuba-GO

Editora Conhecimento Livre, 2022

83 f.: il

DOI: 10.37423/2022.edcl599

ISBN: 978-65-5367-215-4

Modo de acesso: World Wide Web

Incluir Bibliografia

1. microorganismos 2. imunologia 3. parasitologia 4. virologia 5. bacteriologia I. Barbosa, Frederico Celestino II. Título

CDU: 570

<https://doi.org/10.37423/2022.edcl599>

O conteúdo dos artigos e sua correção ortográfica são de responsabilidade exclusiva dos seus respectivos autores.

EDITORA CONHECIMENTO LIVRE

Corpo Editorial

Dr. João Luís Ribeiro Ulhôa

Dra. Eyde Cristianne Saraiva-Bonatto

MSc. Frederico Celestino Barbosa

MSc. Carlos Eduardo de Oliveira Gontijo

MSc. Plínio Ferreira Pires

Editora Conhecimento Livre

Piracanjuba-GO

2022

CAPÍTULO 1	5
ENRIQUECIMENTO DE MELAÇO EM GLICOSE PARA A APLICAÇÃO COMO SUBSTRATO NA PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS	
Edmilson Clarindo de Siqueira	
Laureen Michelle Houllou	
DOI 10.37423/221006632	
CAPÍTULO 2	21
QUALIDADE DE PRODUTOS LÁCTEOS PRODUZIDOS COM KEFIR	
Emanuelle Barbosa de Quadros	
Tainara Naszeniak	
Tiffany Prokopp Hautrive	
Bianca Larsen Zandoná	
Terimar Ruoso	
DOI 10.37423/221006678	
CAPÍTULO 3	38
O PERIGO DAS SUPERFÍCIES INSUSPEITAS, EM UNIDADES DE ATENÇÃO À SAÚDE	
DULCINÉA BLUM-MENEZES	
DANIEL MELLO VIEIRA	
DOI 10.37423/221006704	
CAPÍTULO 4	44
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE CYMBOPOGON CITRATUS (DC) STAPF FRENTE À LEVEDURAS DO GÊNERO CANDIDA SP.	
Luiz Francisley de Paiva	
Sabrina de Alvarenga Domingues	
DOI 10.37423/221006718	
CAPÍTULO 5	57
PENDIMETHALIN BIODEGRADATION BY SOIL STRAINS OF BURKHOLDERIA SP. AND METHYLOBACTERIUM RADIOTOLERANS	
MATHEUS I.S. SANTOS	
MARCUS V.A. BATISTA	
CHARLES S. ESTEVAM	
MARCELO F. FERNANDES	
DOI 10.37423/221006719	
CAPÍTULO 6	70
UTILIZAÇÃO DE BANCO DE DADOS DE DNA NA RESOLUÇÃO DE CRIMES E O PAPEL DO FARMACÊUTICO	
Thacianna Santos de Sousa	
DOI 10.37423/221006727	

Capítulo 1



10.37423/221006632

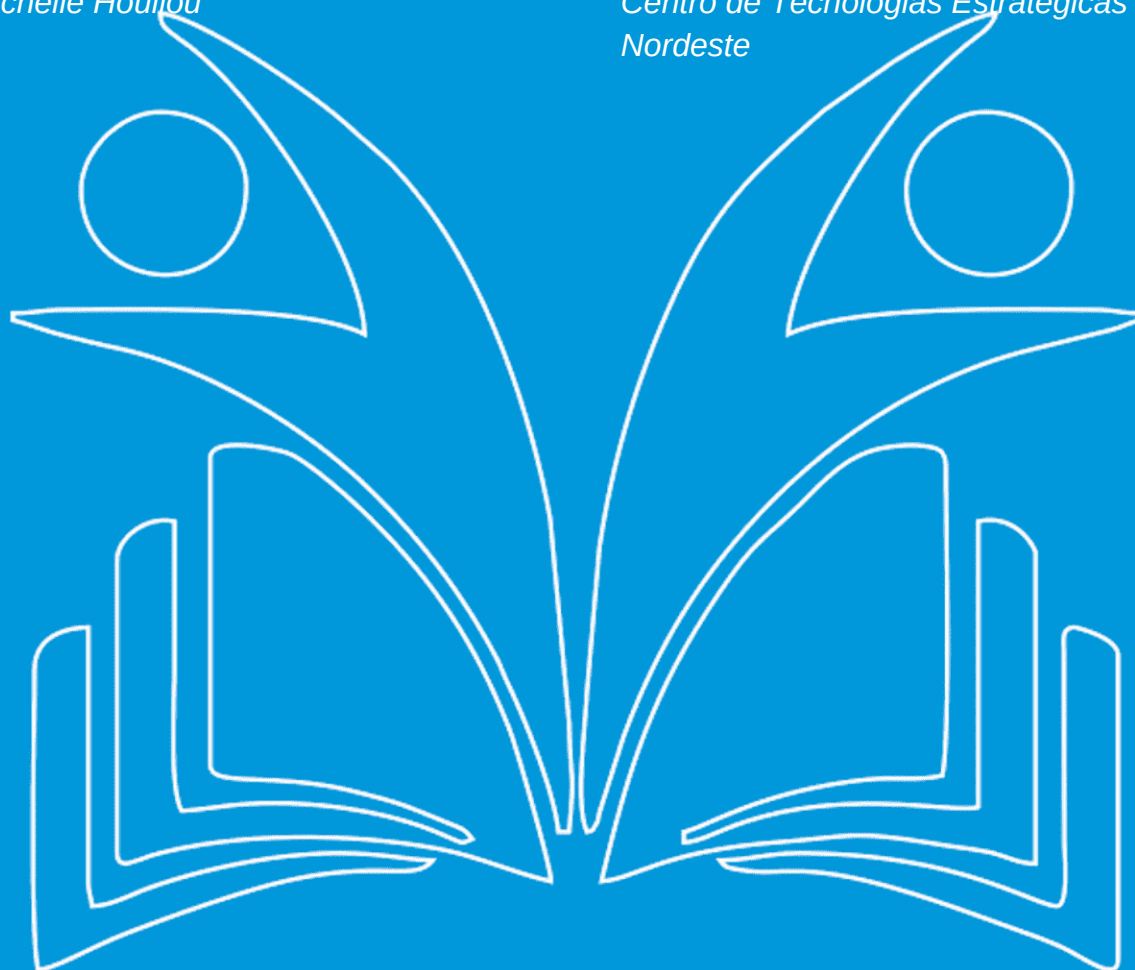
ENRIQUECIMENTO DE MELAÇO EM GLICOSE PARA A APLICAÇÃO COMO SUBSTRATO NA PRODUÇÃO DE POLIHIXIDROXIALCANOATOS

Edmilson Clarindo de Siqueira

*Centro de Tecnologias Estratégicas do
Nordeste*

Laureen Michelle Houllou

*Centro de Tecnologias Estratégicas do
Nordeste*



Resumo: Os polihidroxialcanoatos (PHAs) são um grupo de bioplástico adequados para substituir os plásticos petroquímicos devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e produção amigáveis ao meio ambiente. Um dos maiores produtores de bioplásticos é bactéria *Cupriavidus necator*, que pode acumular até 80 % de PHAs por peso celular seco. A fonte de carbono usada na síntese de PHAs representa cerca 50 % do custo total de produção, por isso, o uso de resíduos agroindustriais tem sido uma opção. Por exemplo, o melaço é um subproduto da indústria açucareira com potencial para reduzir os custos de produção de PHAs. Contudo, a predominância da sacarose na composição do melaço tem sido um viés para *Cupriavidus necator*, que utilizam preferencialmente a glicose como substrato. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi conduzir ensaios comparativos de hidrólise enzimática para o enriquecimento do melaço em glicose e sua aplicação como substrato na produção de PHAs. Para isso, foram realizados dois ensaios de hidrólise usando o fermento biológico Fleischman - AB Foods e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* JP1. Este último consistiu de duas etapas: (i) levantamento de biomassa; e (ii) produção da enzima. Os resultados das hidrólises foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLEA). O ensaio com fermento Fleischman mostrou alterações na área dos sinais dos açúcares, com redução do sinal de sacarose de 6.81533 para 86448 e aumento nos sinais de glicose e frutose, que passou de 1.1067 e 1.15115 para 4.78831 e 4.67977, respectivamente. Os ensaios com *S. cerevisiae* JP1, resultados da fermentação interrompida, rendeu biomassas de 3,36 e 5,46 g para as concentrações de melaço de 2 e 5 %, respectivamente. Como foi supracitado, esses processos de hidrólise são muito importantes para enriquecimento do melaço em glicose devido o seu custo-benefício, mas necessitam de aperfeiçoamento.

Palavras-chave: Melaço. Hidrólise enzimática. Fermento seco. Fermentação interrompida.

1. INTRODUÇÃO

Os polihidroxialcanoatos (PHA) são uma classe de poliésteres lineares sintetizados por vários microrganismos em resposta a condições de estresse fisiológico. São produzidos no interior de células microbianas e armazenados sob a forma de grânulos que servem como material de reserva energética, fonte de carbono e equivalentes redutores (Li & Wilkins, 2020; Novelli, Sayavedra & Rene, 2021). Os PHA possuem aplicações reconhecidas na agricultura e na medicina devido à sua natureza biocompatível e atóxica. Além disso, representam uma alternativa aos plásticos petroquímicos por serem biodegradáveis (Novelli, Sayavedra & Rene, 2021; Alves et al., 2022). Apesar de sua ascensão como bioplástico promissor, o sucesso dos PHA no mercado ainda é restrito devido ao seu alto custo de produção (Alves et al., 2022).

Atualmente, o custo de produção de PHA em escalas piloto e industrial é cerca de 2,5–5,0 €/kg (Bocaz-Beltrán et al., 2021). Valor este, que se mantém superior quando comparado aos custos totais de produção dos plásticos convencionais (<1 €/kg) (Pagliano et al., 2021).

Os fatores principais que tornam o custo de produção de PHA superiores aos plásticos fossilíferos, inclui: (i) o uso de culturas bacterianas puras e engenheiradas metabólica, que requerem condições operacionais completamente estéreis; (ii) os processos ajustantes de extração e purificação usados para obter o PHA como produto final; e (iii) a utilização de substratos refinados como fonte de carbono, que pode representar até 50% do custo total de produção (Novelli, Sayavedra & Rene, 2021; Pagliano et al., 2021; Alves et al., 2022).

Como foi supracitado, a fonte de carbono usada na síntese de bioplásticos pode constituir metade dos custos totais de sua produção. Neste contexto, o uso de fontes alternativas – como resíduos ou subprodutos agroindustriais – tornou-se uma opção elegante para otimizar a produção de PHAs (Bedade, Edson & Gross, 2021). Dentre os resíduos agroindustriais, o melão de cana-de-açúcar tornou-se um subproduto valioso para ser usado na síntese de PHA (Alves et al., 2022). Trata-se de um importante subproduto da indústria açucareira com produção global de 55 milhões de toneladas anual. Contém 40-60% (p/p) de açúcares (sacarose, glicose e frutose), além de minerais como ferro, cálcio, magnésio, potássio, aminoácidos e vitaminas, essenciais para promover o crescimento microbiano (Souza et al., 2014; Souza et al., 2015; Zhang, Wang & Jiang, 2021).

Por outro lado, *Cupriavidus necator* é uma bactéria gram-negativa amplamente investigada na produção de PHAs devido à sua facilidade de cultivo, bioquímica e fisiologia bem compreendidas

(Gahlawat & Soni, 2017; Li & Wilkins, 2020). A *C. necator* possui alta capacidade acumulativa para os bioplásticos, sendo capaz de armazenar até 80% de PHA a partir do peso celular seco (DCW, do inglês *Cell Dry Weight*). Esta capacidade pode ser mantida inalterada mesmo quando são utilizadas fontes renováveis de carbono, como glicose, frutose e glicerol (Li & Wilkins, 2020; Alves et al., 2022). Contudo, a predominância da sacarose na composição do melaço tem sido um viés para bactérias como *C. necator*, que utilizam preferencialmente a glicose como substrato (Gahlawat & Soni, 2017; Arumugam et al., 2019). Neste sentido, a hidrólise biológica do melaço pode ser uma opção para enriquecer o melaço em glicose e torná-lo um substrato mais propício para a síntese de PHA por *C. necator*.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi realizar ensaios de hidrólise enzimática usando o fermento biológico Fleischmann – AB Foods (*Saccharomyces cerevisiae*) e a levedura industrial *S. cerevisiae* JP1 para o enriquecimento do melaço em glicose e, posteriormente, a aplicação deste substrato na produção de PHA.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O melaço utilizado neste trabalho foi gentilmente cedido pela Empresa Pernambucana de Melaço (Empermel), que fica localizada em Jaboatão dos Guararapes, Região Metropolitana do Recife, Pernambuco.

O fermento biológico do tipo Fleischmann – AB Foods foi adquirido em supermercados locais. Já a linhagem industrial *S. cerevisiae* JP1, utilizada neste estudo, é a levedura mais utilizada nas destilarias do Nordeste do Brasil, por isso é de fácil acesso (Reis et al., 2012; Souza et al., 2014; Souza et al., 2015). Todos os demais reagentes químicos e substratos utilizados nos meios de culturas possuíam grau analítico. Outros materiais, equipamentos e insumos serão descritos com os procedimentos experimentais.

2.1 ENSAIOS DE HIDRÓLISE DO MELAÇO PARA ENRIQUECIMENTO EM GLICOSE

Antes de processo de hidrólise, o melaço na sua forma bruta foi diluído na proporção de 1:1 com água destilada e centrifugado a 8.000 rcf por 30 minutos a 25 °C para remover as impurezas. O benefício dessa abordagem é reduzir a viscosidade do melaço bruto para que a demanda de oxigênio não seja afetada e favoreça o crescimento microbiano (Dalsasso et al., 2019). Em seguida foram realizados os ensaios de hidrólise enzimática com o fermento de Fleischmann – AB Foods (Figura 1.A) e a levedura industrial *S. cerevisiae* JP1 (Figura 1.B).

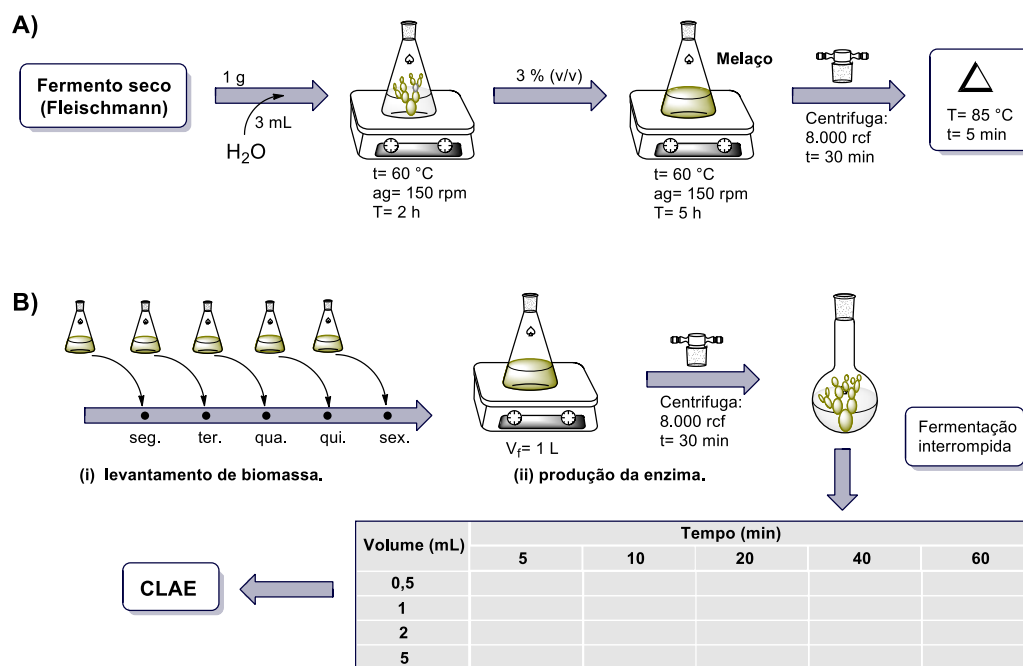


Figura 1: Ensaios hidrolíticos para o enriquecimento do melaço em glicose. Em A, usando fermento de Fleischmann – AB Foods e; em B, usando a linhagem industrial de *S. cerevisiae* JP1.

2.1.1 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO MELAÇO USANDO FERMENTO FLEISCHMANN

Este método consiste no uso de enzimas produzidas por fermento biológico seco (Fleischmann - AB Foods) e foi realizado de acordo com os protocolos descritos por Dalsasso et al. (2019). Resumidamente, o fermento seco foi umedecido com água destilada (na proporção 1:3 g.mL⁻¹) e a suspensão foi mantida a 60 °C e 150 rpm, durante 2 h para promover a autólise (Figura 1.A). Posteriormente, a suspensão de levedura foi adicionada ao melaço na proporção de 3% (v/v) e esta mistura foi mantida a 60 °C e 150 rpm por 5 h. A solução de melaço hidrolisado foi centrifugada por 30 min a 8.000 rcf para separar a suspensão presente no melaço. Por fim, a solução foi aquecida a 85 °C por 5 min para garantir a inativação da enzima e das leveduras residuais.

Este método é particularmente útil no estudo porque contrapõem-se aos métodos químicos de hidrólise que usam ácidos fortes e podem gerar intermediários indesejáveis, como o furfural, um inibidor do crescimento bacteriano (Zafar et al., 2012). Outro benefício dessa abordagem é a facilidade de acesso aos materiais, uma vez que o fermento de padreiro pode ser encontrado em qualquer supermercado local.

2.1.2 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO MELAÇO USANDO A LINHAGEM S. CEREVISIAE JP1

As leveduras, especialmente as espécies *S. cerevisiae*, são dotadas de grande capacidade fermentativa, por isso suas células são amplamente empregadas em processos hidrolíticos (Reis et al., 2012; Souza et al., 2014; Souza et al., 2015).

O segundo método de foi utilizado para identificar uma possível redução ainda acentuada dos custos totais com o processo de hidrólise. Para isso, os ensaios foram conduzidos baseados no arcabouço conceitual denominado de fermentação interrompida (Reis et al., 2012; Souza et al., 2014; Souza et al., 2015; Fusco et al., 2019). Em resumo, esta abordagem consiste de duas etapas básicas: (i) o levantamento de biomassa úmida (células), que é realizado em um intervalo de uma semana, em que volumes proporcionais de melaço (ou sacarose) são fornecidos à levedura até completar um volume final de 1 L; e (ii) a produção propriamente dita da enzima, contida no sobrenadante (Figura 1.B).

Após a centrifugação das células (descrito na seção 2.1.1), volumes crescentes (0,5, 1, 2 e 5 mL) do sobrenadante gerado (rico em enzimas) foram adicionados em um meio contendo melaço (°Brix 10 %) para formar um volume final 50 mL. Amostras de cada meio foram coletadas em tempos crescentes (5, 10, 20, 40 e 60 min), filtradas e processadas por cromatografia líquida de alta eficiência – CLEA (Figura 1.B). O objetivo deste ensaio foi encontrar a correlação entre o volume e o tempo de hidrólise total do substrato (Souza et al., 2014; Souza et al., 2015; Fusco et al., 2019). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

O rendimento da hidrólise (%H) é dado a partir da correlação entre o °Brix e os açúcares totais redutores (TRS, sigla do inglês). Para a obtenção da curva de calibração e, cosequentemente, a determinação dos TRS, é utilizado o método do Fenol-Sulfúrico (Dubois et al., 1956).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A bactéria *C. necator* é de longe o microrganismo mais estudado na produção de PHA, com capacidade de acumular biopolímeros em até 90% de DCW (Arumugam et al., 2019). Esta bactéria utiliza principalmente a via da glicólise (Via I), onde a glicose é utilizada como fonte de carbono para gerar acetil-CoA, o precursor da síntese de PHA (Figura 2).

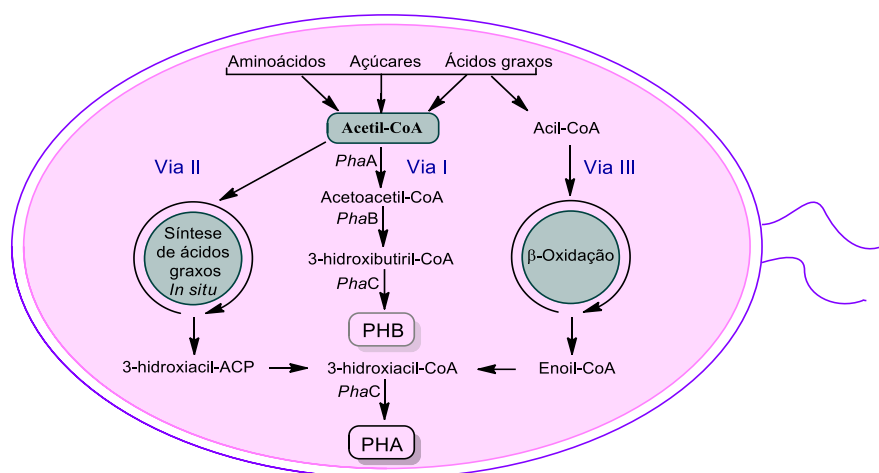


Figura 2: Vias metabólicas para a síntese de PHAs.

Como mostrado na Figura 2, a conversão de acetil-CoA em acetoacetyl-CoA é catalisada pela enzima 3-cetotiolase (*PhaA*). O acetoacetyl-CoA gerado é posteriormente convertido em 3-hidroxiacetyl-CoA pela acetoacetyl-CoA redutase (*PhaB*) e, finalmente, a enzima PHA sintase (*PhaC*) produz os PHA (Arumugam et al., 2019). A partir da Via I (Figura 2), a bactéria *C. necator* é capaz de produzir PHAs a partir de hidrolisados de biomassas diferentes (Alves et al., 2022).

Por sua vez, o melaço de cana de açúcar é um dos substratos mais utilizados na produção de PHA devido ao seu baixo preço e abundância, que pode chegar a 33-50% do preço da glicose (Zhang, Wang & Jiang, 2021; Alves et al., 2022). Contudo, o melaço contém predominantemente 50% de sacarose com menores quantidades de glicose e frutose (Shasaltaneh et al., 2013). A hidrólise enzimática desse resíduo representou uma ferramenta inestimável no fornecimento de matéria-prima renovável para a relação custo-benefício e sustentabilidade na produção de bioplásticos em escala comercial (Li & Wilkins, 2020; Bedade, Edson & Gross, 2021).

3.1 ANÁLISE DA HIDRÓLISE DO MELAÇO PELO FERMENTO FLEISCHMANN

O primeiro conjunto de análises examinou o impacto do fermento Fleischmann - AB Foods no enriquecimento do melaço em glicose (Figura 2.A). Os resultados obtidos para o melaço antes (B) e após a hidrólise enzimática, usando fermento de padreiro (C), são apresentados a seguir:

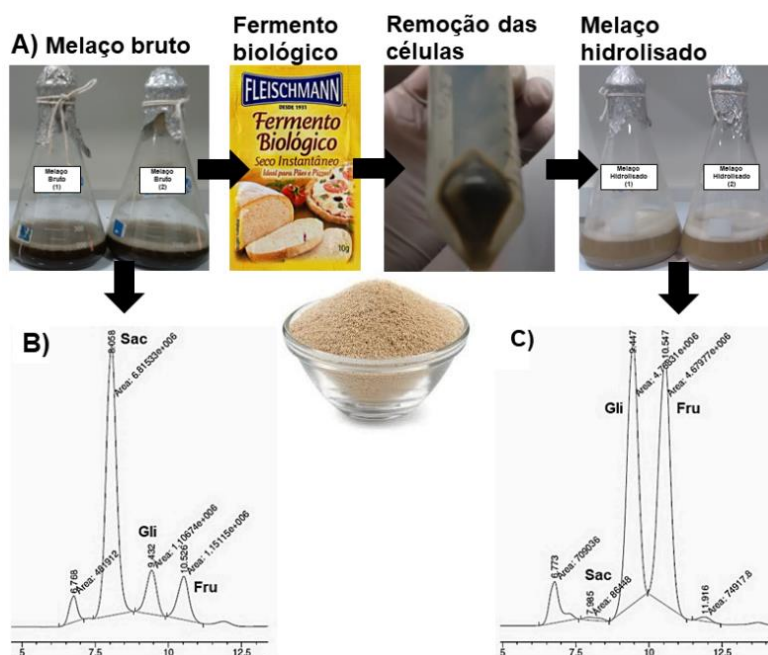


Figura 2: Representação esquemática da hidrólise do melaço usando o fermento Fleischmann - AB Foods (A). Análise por HPLC do melaço puro (B) e após sua hidrólise enzimática (C), onde Sac= sacarose, Gli= glicose e Fru= frutose.

Conforme mostrado na Figura 2, a sacarose, glicose e frutose aparecem no cromatograma nos tempos de 7,0, 9,0 e 10,0 min, respectivamente. Como mostrou a Figura 2, houve alterações significativas nas áreas dos sinais dos açúcares, indicando uma diminuição na concentração de sacarose e um aumento na concentração de glicose e frutose. O sinal da sacarose reduziu de 6.815 para 865, enquanto os sinais de glicose e frutose, passaram de 1.107 e 1.151 para 4.788 e 4.680, respectivamente.

Nesta investigação, existem várias fontes de erro. O principal erro foi que os padrões para determinação da curva de carboidratos totais mostraram uma correlação linear a olho nu (Figura 3.A). Contudo, isso não foi verificado nas leituras do espectro UV-Vis ($\lambda = 490$ nm) em função da concentração. Provavelmente, essa não correlação pode ter ocorrido devido à descalibração das pipetas utilizadas, uma vez que as mesmas precisavam de calibração. Portanto, no presente trabalho o método do Fenol-Sulfúrico não apresentou linearidade e, neste sentido, o procedimento necessita ser refeito.

Voltando agora para as evidências experimentais sobre a hidrólise com o fermento Fleischmann. A Figura 3 faz uma comparação dos resultados da análise por cromatografia em camada delgada (CCD) do melaço (M) e do melaço hidrolisado (MH). É possível verificar um aumento no teor de glicose no MH, sugerindo que a hidrólise ocorreu (Figura 3.B).

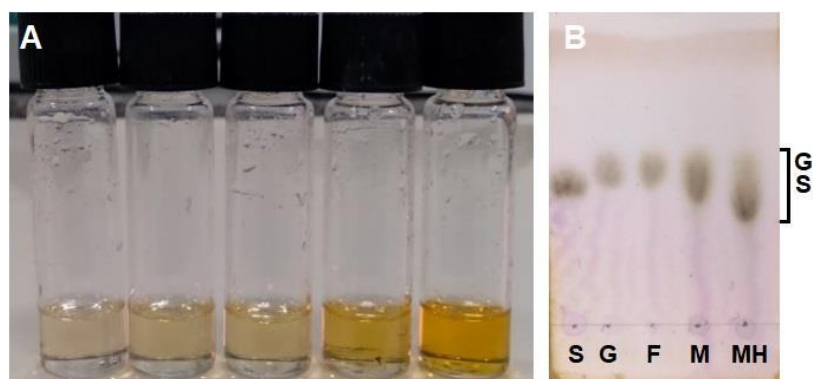


Figura 3: Padrões para determinação da curva de carboidratos (A). Cromatografia em camada delgada do melaço (M) e melaço hidrolisado (MH), onde S=sacarose, G= glicose e F=frutose.

Tomados em conjunto, essas análises sugerem que existe uma associação entre os resultados de CLAE e CCD, confirmando a hidrólise do melaço pelo fermento de padreiro. A partir do método de hidrólise usando o fermento Fleischmann - AB Foods, pode-se obter um rendimento de até 75% de melaço na forma hidrolisada (Dalsasso et al., 2019). As vantagens deste ensaio é o baixo custo e a facilidade de sua execução.

Apesar de ser considerado um método de baixo custo e fácil execução, é possível que a substituição do método com o fermento Fleischmann pela hidrólise enzimática usando levedura *S. cerevisiae* JP1 possa otimizar ainda mais o processo como um todo. Essa possibilidade foi sugerida em discussões acerca do uso da levedura *S. cerevisiae* JP1 a partir do método da fermentação interrompida descrito anteriormente (Souza et al., 2015).

A etapa 1 da fermentação interrompida consistiu no levantamento da biomassa úmida (células). Para esta etapa, foram realizados dois ensaios que resultou em 3,36 e 5,46 g de células para soluções de melaço com °Brix iguais a 2 e 5 %, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1: Levantamento da biomassa de *S. cerevisiae* JP1 (1), para produção de enzimas (2).

Etapa	Melaço	Volume	Produto	Rendimento
1	2 %	1 L	Biomassa	3,36 g
	5 %	1 L	Biomassa	5,46 g
2	10 %	50 mL	Sobrenadante	40 mL

Para a etapa 2 da fermentação interrompida usou-se a maior quantidade de células (5,46 g) obtidas na etapa 1. As células foram misturadas com a solução de melaço (10 %) para a produção enzimática. Esta etapa rendeu cerca de 40 mL de sobrenadante enriquecido enzimaticamente (Tabela 1).

A marcha para obtenção dos 40 mL de sobrenadante enriquecido enzimaticamente é apresentado na Figura 4, a seguir:

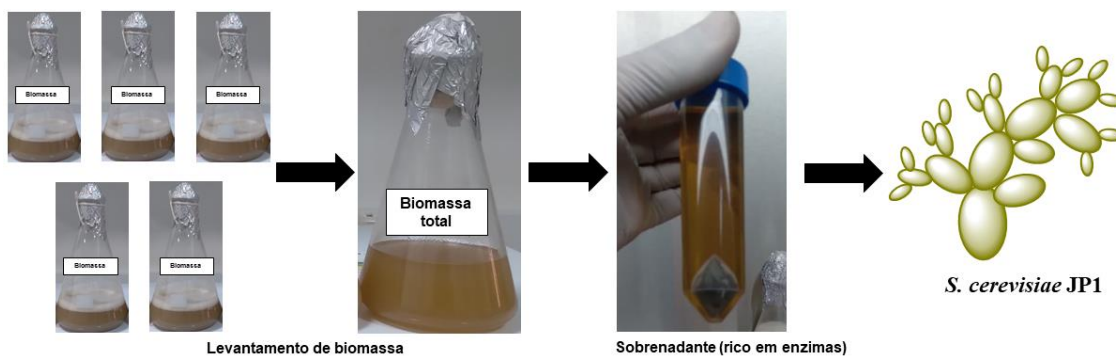


Figura 4: Representação esquemática para a obtenção de sobrenadante enriquecido enzimaticamente.

O presente ensaio foi desenhado para correlacionar o volume ideal de sobrenadante (enzimas) e o tempo necessário para a realização da hidrólise total do substrato e sua conversão em glicose e frutose. O ponto mais importante deste ensaio foi desenvolver uma imagem completa da hidrólise por *S. cerevisiae* JP1 antes que esta levedura começasse a consumir toda a glicose disponível (resultante da hidrólise). Os resultados da correlação volume enzimático x tempo de hidrólise são apresentados sob a forma de cromatogramas de CLAE (Figura 5).

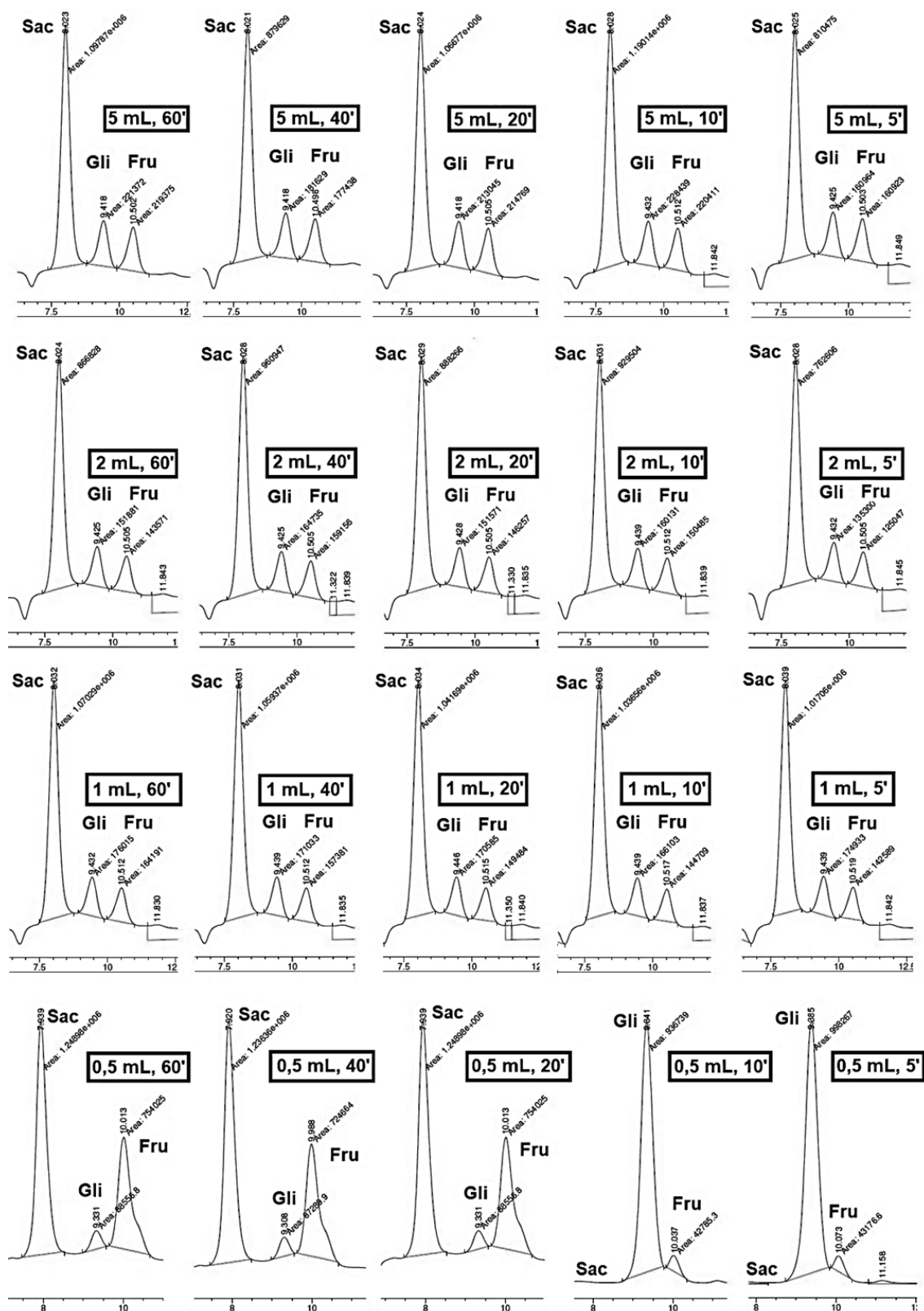


Figura 5: Análise da hidrólise usando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* JP1.

Como mostrado na Figura 5, os níveis de sacarose se mantiveram altos, ao contrário dos níveis de glicose e frutose. Também não foram observadas alterações nas áreas dos sinais desses açúcares para os volumes de 1,0-5,0 mL ao longo de todos os intervalos de tempo testados. Nestas condições, a área

da sacarose se manteve entre 700-1100, enquanto glicose e frutose apresentaram áreas entre 130-230 e 120-220, respectivamente. Contudo, para o menor volume de sobrenadante (0,5 mL), nos tempos de 20, 40 e 60 min, observou-se um pico de área maior para a frutose (720-760); sem alterações no pico da sacarose. Já para os intervalos de tempo de 5 e 10 min, o sinal da sacarose praticamente não apareceu; porém, o sinal da glicose aparece com bastante intensidade (930-1000).

Durante as últimas décadas, houve um grande interesse na produção econômica e ambientalmente viável de bioplásticos do tipo PHA com o objetivo de resolver problemas ambientais decorrentes da produção e acúmulo de plásticos petroquímicos (Arumugam et al., 2019). A seleção de subprodutos agroindustriais baratos, como melaço de cana-de-açúcar, tem sido uma alternativa para reduzir os custos totais de produção de PHA (Li & Wilkins, 2020; Novelli, Sayavedra & Rene, 2021). Para ser utilizado como fonte de carbono adequada por microrganismos, o melaço deve conter pelos menos 75% de carboidratos, como sacarose, glicose e frutose (Zhang, Wang & Jiang, 2021). Por sua vez, um dos maiores acumuladores de PHA – a bactéria *C. necator* – tem preferência por glicose e frutose, mas não pela sacarose (Arumugam et al., 2019).

O uso de enzimas acessíveis como fermento biológico (Fleischmann - AB Foods) e levedura *S. cerevisiae* JP1 representam uma abordagem interessante para o enriquecimento do melaço em glicose. De acordo com os resultados do presente trabalho, o pré-tratamento enzimático do melaço induziu a formação da glicose nas duas abordagens investigadas. Como foi mencionado anteriormente, o processo de hidrólise usando o fermento Fleischmann é muito importante do ponto de vista custo-benefício, mas necessita de aprimoramento para ser usado como ferramenta adjuvante na produção substratos rico em glicose para a síntese de PHA (Dalsasso et al., 2019).

Na abordagem usando a linhagem *S. cerevisiae* JP1, os níveis de biomassa observados na etapa de levantamento celular foram muito abaixo dos observados na literatura (Souza et al., 2015). Isso pode ser explicado pela utilização do melaço nessa fase do trabalho (em substituição à sacarose). A escolha do melaço foi idelaizada como forma de baratear ainda mais o processo; contudo é sabido que a sacarose promove uma maior biomassa (~10 g) após o estágio final do processo (Souza et al., 2014; Souza et al., 2015).

Os experimentos para a fermentação interrompida com *S. cerevisiae* JP1 não evidenciaram a formação de glicose nos intervalos acima de 10 min. É possível supor que em tempos maiores que 10 min, é menos provável ocorrer a formação da hexose devido à repressão catabólica, que faz com que a

glicose seja consumida rapidamente e outros açúcares se acumulam em uma alta concentração, inibindo o crescimento dos microrganismos ou a atividade hidrolítica da enzima (Li & Wilkins, 2020).

Estudos anteriores relataram que a hidrólise do melaço aumenta os teores de açúcares fermentáveis tornando-o um excelente substrato para a produção de PHAs. Por exemplo, o melaço pré-tratado com H₂SO₄ forneceu um aumento significativo na produção de PHA (~50 % do DCW) por *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* (Li & Wilkins, 2020).

Dalsasso et al. (2019), usaram melaço previamente hidrolisado para produzir o polihidroxibutirato (PHB) por *C. necator* DSM 545 e obtiveram cerca de 56 % de PHB (do DCW). Neste trabalho, os autores compararam a hidrólise do melaço por métodos químicos (HCl e H₂SO₄) e enzimático (invertase e fermento de padeiro). Na hidrólise química, o HCl forneceu melhor rendimento (92 %), em relação ao H₂SO₄ (50 %); enquanto que na hidrólise enzimática, o rendimento usando a invertase foi superior, com 90 % de conversão comparado ao fermento de padaria (75%).

Recentemente, foi relatada a produção de PHB por *Cupriavidus necator* ATCC 25207 usando frutose, glicose e melaço hidrolisado com ácido ou enzima (Erlan, Keskinler & Tanriseven, 2021). As concentrações de PHB obtidas foram 4,99 g/L, 3,94 g/L e 15,28 g/L usando frutose, glicose e melaço hidrolisado com ácido, respectivamente. O melaço tratado com ácido sulfúrico e invertase rendeu 1288% e 529% mais PHB do que o melaço não tratado. Esta nova descoberta pode ter aplicações em fermentações usando melaço em meio de crescimento ou produção.

No estudo atual, foi realizada a hidrólise do melaço usando apenas métodos enzimáticos. As leveduras do fermento Fleischmann - AB Foods e *S. cerevisiae* JP1 foram escolhidas com base na semelhança em suas velocidades de crescimento (Souza et al., 2014; Souza et al., 2015). Esta é uma questão importante para pesquisas futuras porque, ao contrário dos métodos de hidrólise química, a hidrólise enzimática é seletiva e não gera compostos intermediários indesejáveis que podem inibir o crescimento microbiano. Por exemplo, a presença de substâncias tóxicas no melaço, devido à hidrólise parcial da sacarose em glicose e frutose com ácido sulfúrico, foi considerada como inibidora do crescimento da *Escherichia coli* recombinante (Zafar et al., 2012).

Além disso, foi verificado que o melaço tratado com ácidos resultou em 151% a mais PHB; porém, houve 34,04% menos crescimento celular do que o melaço hidrolisado com enzima (Erlan, Keskinler & Tanriseven, 2021).

4. CONCLUSÃO

Os processos de hidrólise (química e enzimática) possuem ampla aplicação na indústria açucareira. Embora esses dois métodos sejam eficientes, a hidrólise enzimática possui a vantagem adicional de ser seletiva e não gerar compostos indesejáveis inibidores do crescimento microbiano. Neste estudo duas fontes enzimáticas (o fermento Fleischman e a cepa *S. cerevisiae* JP1) foram avaliadas quanto à sua eficiência hidrolítica no enriquecimento do melaço em glicose. Os ensaios de hidrólise usando o fermento Fleischman mostraram resultados promissores, além de ser um método de fácil execução e baixo custo. Por sua vez, a hidrólise enzimática usando a linhagem *S. cerevisiae* JP1 mostrou também ser uma opção interessante. Contudo, este método necessita ainda de aperfeiçoamentos para que possa, de fato, conseguir resultados mais claros.

5. AGRADECIMENTO

Ao Programa de Capacitação Institucional (PCI) do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

6. REFERÊNCIAS

- Alves, A. A., Siqueira, E. C., Barros, M. P. S., Silva, P. E. C., & Houllou, L. M. (2022). Polyhydroxyalkanoates: a review of microbial production and technology application. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s13762-022-04213-9>.
- Arumugam, A., Anudakshaini, T. S., Shruthi, R., Jeyavishnu, K., Harini, S. S. & Sharad, J. S. (2019). Low-cost production of PHA using cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) juice as potential substrate: optimization and characterization. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 10, 1167-1178. doi:10.1007/s13399-019-00502-5.
- Bedade, D. K., Edson, C. B. & Gross, R. A. (2021). Emergent approaches to efficient and sustainable polyhydroxyalkanoate production. *Molecules*, 26, 3463, 155. <https://doi.org/10.3390/molecules26113463>.
- Bocaz-Beltrán, J., Rocha, S., Pinto-Ibieta, F., Ciudad, G. & Cead, M. (2021). Novel alternative recovery of polyhydroxyalkanoates from mixed microbial cultures using microwave-assisted extraction. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 96, 9, 2596-2603. doi:10.1002/jctb.6802.
- Dalsasso, R. R., Pavan, F. A., Bordignon, S. E., Aragão, G. M. F. & Poletto, P. (2019). Polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Cupriavidus necator* from sugarcane vinasse and molasses as mixed substrate. *Process Biochemistry*, 85, 12-18. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.07.007>.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P. & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical Chemistry*, 28, 3, 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>.
- Ertan, F., Keskinler, B. & Tanriseven, A. (2021). Exploration of *Cupriavidus necator* ATCC 25207 for the production of poly(3-hydroxybutyrate) using acid treated beet molasses. *Journal of Polymers and the Environment*, 29, 2111-2125. <https://doi.org/10.1007/s10924-020-02020-2>.
- Fusco, D. O., Madaleno, L. L., Del Bianchi, V. L., Bernardo, A. S., Assis, R. R. & Teixeira, G. H. A. (2019). Development of low-alcohol isotonic beer by interrupted fermentation. *International Journal of Food Science and Technology*, 54, 2416-2424. doi:10.1111/ijfs.14156.
- Gahlawat, G. & Soni, S. K. (2017). Valorization of waste glycerol for the production of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer by *Cupriavidus necator* and extraction in a sustainable manner. *Bioresource Technology*, 243, 492-501. doi:10.1016/j.biortech.2017.06.139.
- Li, M. & Wilkins, M. R. (2020). Recent advances in polyhydroxyalkanoate production: Feedstocks, strains and process developments. *International Journal of Biological Macromolecules*, 156, 691-703. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.082>.
- Novelli, L. D., Sayavedra, S. M. & Rene, E. R. (2021). Polyhydroxyalkanoate (PHA) production via resource recovery from industrial waste streams: A review of techniques and perspectives. *Bioresource Technology*, 331, 124985. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124985>.

Pagliano, G., Galletti, P., Samorì, C., Zaghini, A. & Torri, C. (2021). Recovery of polyhydroxyalkanoates from single and mixed microbial cultures: A review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 624021, 1-28. doi: 10.3389/fbioe.2021.624021.

Reis, V. C. B., Nicola, A. M., Oliveira Neto, O. S., Batista, V. D. F., Moraes, L. M. P. & Torres, F. A. G. (2012). Genetic characterization and construction of an auxotrophic strain of *Saccharomyces cerevisiae* JP1, a Brazilian industrial yeast strain for bioethanol production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39, 1673-1683. doi:10.1007/s10295-012-1170-5.

Shasaltaneh, M. D., Moosavi-Nejad, Z., Gharavi, S. & Fooladi, J. (2013). Cane molasses as a source of precursors in the bioproduction of tryptophan by *Bacillus subtilis*. *Iran Journal of Microbiology*, 2013, 5, 285-292.

Souza, R. B., Menezes, J. A. S., Souza, R. F. R., Dutra, E. D., & Morais Jr., M. A. (2014). Mineral Composition of the Sugarcane Juice and Its Influence on the Ethanol Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175, 1, 209-222. doi:10.1007/s12010-014-1258-7.

Souza, R. B., Silva, R. K., Ferreira, D. S., Paiva Junior, S. S. L., Pita, W. B. & Morais Junior, M. A. (2015). Magnesium ions in yeast: setting free the metabolism from glucose catabolite repression. *Metallomics*, 8, 11, 1193-1203. doi:10.1039/c6mt00157b.

Zafar, M., Kumar, S., Kumar, S. & Dhiman, A. K. (2012). Modeling and optimization of poly(3hydroxybutyrate-co-3hydroxyvalerate) production from cane molasses by *Azohydromonas lata* MTCC 2311 in a stirred-tank reactor: effect of agitation and aeration regimes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39, 987-1001. doi:10.1007/s10295-012-1102-4.

Zhang, S., Wang, J. & Jiang, H. (2021). Microbial production of value-added bioproducts and enzymes from molasses, a byproduct of sugar industry. *Food Chemistry*, 346, 128860, 114. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128860>.

Capítulo 2



10.37423/221006678

QUALIDADE DE PRODUTOS LÁCTEOS PRODUZIDOS COM KEFIR

Emanuelle Barbosa de Quadros

Universidade Federal de Santa Maria

Tainara Naszeniak

Universidade Federal de Santa Maria

Tiffany Prokopp Hautrive

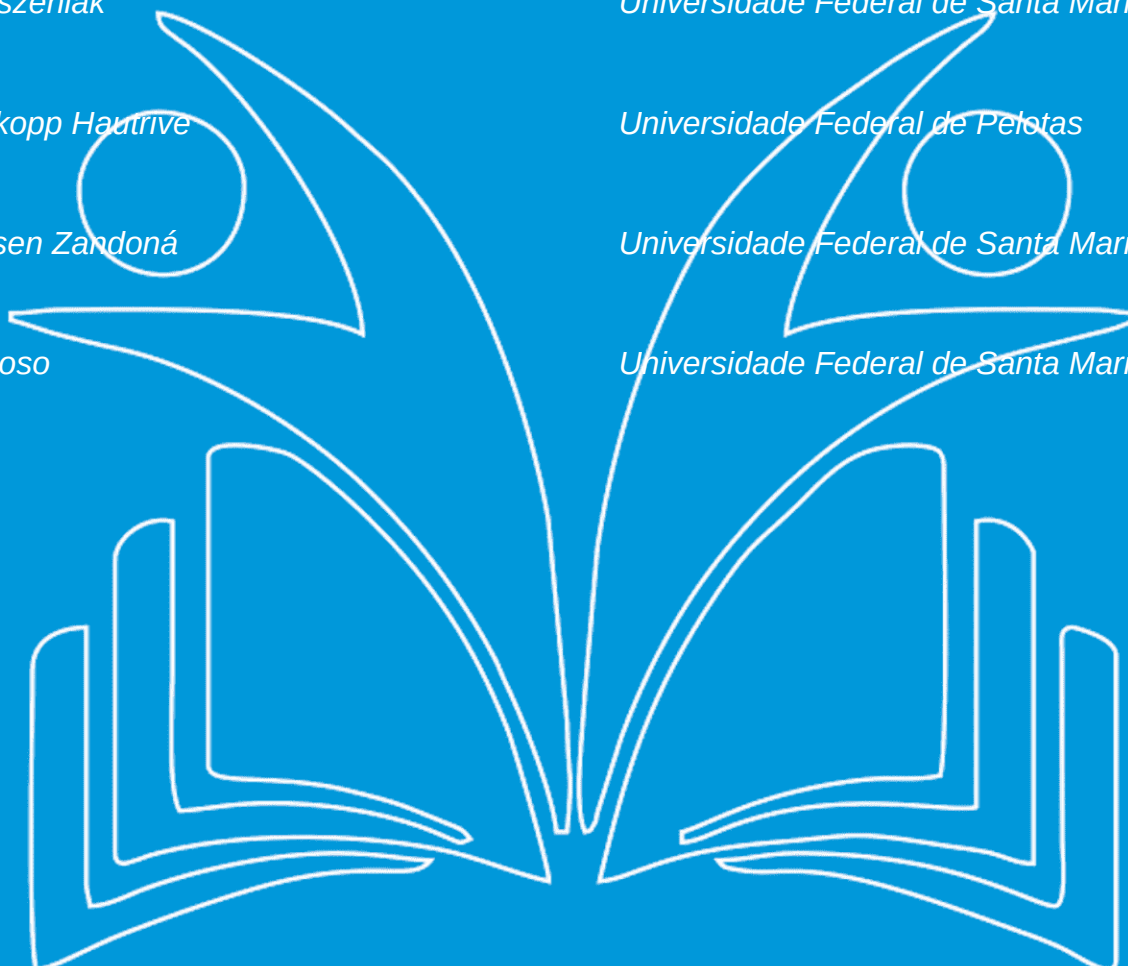
Universidade Federal de Pelotas

Bianca Larsen Zandoná

Universidade Federal de Santa Maria

Terimar Ruoso

Universidade Federal de Santa Maria



Resumo: **Introdução:** O kefir é um alimento com potencial probiótico, caracterizado como leite fermentado a partir de grãos iniciadores, formados pela associação simbiótica de leveduras, bactérias ácidas e ácido acético. **Objetivo:** Este trabalho teve como objetivo produzir e analisar as qualidades físico-químicas, microbiológicas e sensoriais de um iogurte e uma bebida láctea produzidos a partir do kefir e avaliar sua estabilidade por 28 dias. **Método:** Realizou-se análises de pH, acidez titulável, proteína, gordura, bactérias ácido lácticas, coliformes totais e termotolerantes, *psicrotróficos*, *Staphylococcus coagulase* positiva e leveduras. A intenção de compra, de consumo e avaliação global foi realizada com 100 participantes por meio de análise sensorial. **Resultados:** Os produtos apresentaram valores satisfatórios de gordura, pH, acidez, proteínas, Bactérias Ácido Lácticas (BALs), *psicrotróficos*, *Staphylococcus*, e Coliformes Totais e Termotolerantes. A quantidade de leveduras foi adequada no iogurte. A análise sensorial foi classificada de modo global como “gostei ligeiramente”, os participantes declararam que comprariam se estivesse acessível e que consumiriam ocasionalmente. **Conclusão:** Concluiu-se que tanto a bebida láctea quanto o iogurte de kefir possuem potencial de produção e comercialização. Os dois produtos desenvolvidos apresentaram boas condições higiênico sanitárias, bactérias ácido lácticas viáveis ao longo da vida de prateleira, aspectos físico-químicos dentro do preconizado por legislação, exceto valores de leveduras na bebida láctea, entretanto, estudos precisam ser realizados para o aprimoramento das características sensoriais bem como reavaliação do teor proteico e quantificação de leveduras.

Palavras-chave: Kefir. Produtos Lácteos. Microbiologia de Alimentos.

INTRODUÇÃO

A busca por uma alimentação saudável tem fomentado estudos para conhecer o potencial dos alimentos disponíveis, desenvolver e caracterizar novos produtos alimentícios. Nesse contexto, destaca-se o kefir, provindo de processo fermentativo e presente na vida do homem há milênios, mas que somente nos dias de hoje tem ganhado mais consumidores. Inicialmente a fermentação dos alimentos era vinculada à fins de conservação, mas hoje é empregada também para diversificar os produtos existentes, agregando potencial probiótico e oferecendo um sabor peculiar (1).

O kefir difere dos outros fermentados por possuir cultura iniciante (starter) que está nos grãos de kefir, e tem como resultado um sistema biológico bastante complexo com associação simbiótica entre leveduras, bactérias ácido lácticas (BALs) e ácido acéticas (BAAs), rodeadas pelo kefiran, uma matriz gelatinosa. A Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) descrevem o kefir no Codex Standard para leites fermentados da seguinte forma: “Cultura inicial preparada a partir de grãos de *kefir*, *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* crescendo em uma forte relação específica. Os grãos de kefir são formados por leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*) (2). Por ser produzido e cultivado artesanalmente, o principal obstáculo é a dificuldade de padronização da sua qualidade, devido a variabilidade da microbiota nos grãos do kefir e da matéria prima. Mesmo assim o kefir é amplamente consumido em todo o mundo pois possui características funcionais que têm sido estudadas (3).

Os efeitos benéficos do consumo de produtos derivados do kefir vêm sendo estudados constantemente na saúde e nutrição humana (4) (5). Dentre os efeitos benéficos encontram-se os efeitos anti-hipertensivos, efeito redutor de colesterol, atividade antimicrobiana, atividade anticancerígena, bem como efeitos imunomoduladores e anti-inflamatórios (6). Além dos benefícios a microbiota intestinal, diminuindo o estresse oxidativo, melhorando a digestão da lactose, prevenindo doenças intestinais e inflamatórias, além de dislipidemias (7).

A diversidade microbiana presente no kefir, tem potencial para lhe conferir o grau de alimento probiótico, isto é, quando a porção do kefir apresenta população microbiana capazes de conferir benefícios à saúde do hospedeiro, capacidade de resistir ao suco gástrico, exposição à bile, e conseguir se proliferar colonizando o trato digestivo em quantidade adequadas. Ainda, para serem considerados probióticos, os produtos lácteos devem ter boas propriedades tecnológicas, ter uma vida de prateleira

aceitável, tolerância a aditivos, contribuir para um bom sabor, aroma, textura, e garantir que o processo fermentativo evite contaminações (8). A composição microbiana do kefir pode ser variável, pois sofre com a variação geográfica, da origem, do tempo de fermentação, do substrato utilizado, do local de cultivo, e dos cuidados na fabricação (9). Durante a fermentação os grãos aumentam o volume, se multiplicam muito rápido, passando propriedades às gerações seguintes, e liberando os microrganismos no leite (10).

O processo fermentativo do Kefir gera compostos bioativos que proporcionam sabor, aroma e textura característicos além de apresentarem propriedades nutracêuticas (11). A conversão de lactose em ácido lático, resulta na formação de outras substâncias como dióxido de carbono produzido pelas leveduras, ácido acético, álcool, diacetil e acetaldeído, que conferem as características sensoriais singulares ao produto (12) (13). As bactérias ácido lácticas contribuem para a preservação do produto por meio de ácido lático, inclusive às propriedades organolépticas produzindo novos compostos voláteis (14) (15).

Alguns critérios são dados sobre a composição do kefir (produto final), que são mínimo de proteína do leite (2,7% m/m), gordura (<10% m/m), acidez titulável (0,6% m/m como ácido lático) e número de microrganismos (10^7 UFC/g) e levedura (10^4 UFC/g) presentes na cultura iniciadora (2).

Por ser um produto de fabricação essencialmente caseira, as características do leite fermentado de kefir carecem de estudos e ainda não tem qualidade padronizada. Esse trabalho teve como principal objetivo avaliar a qualidade físico-química, microbiológica e sensorial de dois produtos lácteos de fabricação doméstica a partir do kefir.

METODOLOGIA

Foram elaborados dois produtos a partir da fermentação com kefir (iogurte e bebida láctea), cada um deles foi analisado quanto a estabilidade físico-química e microbiológica ao longo de 28 dias de armazenamento refrigerado (7°C), partindo do tempo 0.

O estudo foi conduzido nos laboratórios: Laboratório de Microbiologia (CEMICRO), Laboratório de Análise Sensorial (LASENSO), Laboratório de Técnica e Dietética (LABTED) e Laboratório de Bromatologia da Universidade Federal de Santa Maria-Campus Palmeira das Missões/RS.

Os grãos de kefir utilizados neste estudo foram adquiridos de uma família residente no município de Palmeira das Missões/RS. Os demais ingredientes como: o leite desnatado esterilizado (UHT), a essência de baunilha, tâmara e a ameixa seca, foram obtidos no comércio local.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os dois produtos foram preparados no mesmo dia, com os ingredientes e quantidades conforme a Tabela 1.

A produção ocorreu em duas etapas, primeiramente a fermentação do leite com os grãos de kefir, depois a produção do iogurte e da bebida láctea. Na primeira etapa, a fermentação, ocorreu por meio de adição de grãos de kefir (10g) em 1 litro de leite desnatado esterilizado (UHT), por aproximadamente 24 horas à temperatura (25°C) em estufa de crescimento bacteriano. Após as 24 horas, os grãos foram coados com o auxílio de uma peneira de plástico, e posteriormente os grãos foram submetidos à nova fermentação com 1 litro de leite desnatado esterilizado (UHT), e fermentado por mais 24 horas para produzir o leite fermentado para a produção do iogurte. Enquanto isso, o leite fermentado da primeira fermentação ficou dessorando em filtro por 24 horas sob refrigeração (7°C), e originou o soro de kefir, utilizado para produzir a bebida láctea que não teve adição de cultura, apenas do soro provindo do leite fermentado do kefir. Todos os procedimentos foram realizados seguindo as normas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) conforme Resolução 326 de 30 de julho de 1997.

Foram realizadas análises físico-químicas e sensoriais dos produtos lácteos, e análise microbiológica dos produtos lácteos e dos grãos/grumos de kefir.

ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

Todos os procedimentos descritos a seguir foram feitos em triplicata. O pH foi determinado com potenciômetro, por 28 dias, conforme o manual do fabricante (16). Determinação de acidez em ácido láctico por titulação realizada de acordo com o Instituto Adolfo Lutz (16) e a Instrução Normativa 68 (17). Foram feitas determinações de proteína bruta através do método de Kjeldahl (18) e de gordura através do descrito por Bligh & Dyer (19).

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

As análises microbiológicas realizadas foram: quantificação de BALs; contagem de leveduras. A qualidade higiênico-sanitária foi determinada pela presença de coliformes, *E. coli*; *Staphylococcus coagulase* positiva e contagem de psicotrófilos. Todos os testes foram realizados em duplicata. As amostras foram preparadas conforme (20), em sacos estéreis, homogeneizados no Stomacher e agitador tipo vortex. Foram diluídos até obter a diluição 10⁻⁶ (20).

A contagem de BALs foi realizada de acordo com Silva et al. (20), utilizando-se Ágar de Man Rogosa & Sharpe (MRS), com plaqueamento pourplate e sobrecamada, incubados à 32°C por 48 horas.

Para contagem de leveduras plaqueou-se as amostras em superfície do meio Ágar batata glicose 2% (BDA), pH 3,5 (acidificado com ácido tartárico 10%) por plaqueamento em superfície, incubou-se as placas a 25°C por 7 dias, sem inverter (21) (20).

Para a verificação de coliformes utilizou-se a técnica do Número Mais Provável (NMP) utilizando LST (19) (21) (22).

Para contagem de microrganismos psicrotróficos foi feito plaqueamento em superfície, com Ágar Padrão para Contagem (PCA). As placas foram incubadas por 7 dias à 7+1°C (20). Análise de *Staphylococcus coagulase* positiva foi realizada de acordo (20), utilizando-se Ágar Manitol Sal (23). Incubou-se as placas à 35-37°C por 18-24h em seguida as colônias suspeitas foram submetidas ao teste da coagulase.

ANÁLISE SENSORIAL

Para a realização da análise sensorial, o projeto foi aprovado no comitê de ética (CEP) da UFSM. Sob parecer 01933418.7.0000.5346, seguindo a Resolução 466 de 12 de dezembro de 2012. Os consumidores que concordaram em participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foram convidados a participar da pesquisa, de forma voluntária, pessoas de ambos os sexos, servidores, alunos e professores da Universidade Federal de Santa Maria, Campus Palmeira das Missões, Rio Grande do Sul. Os critérios de inclusão considerados foram: ser maior que 18 anos. E os critérios de exclusão foi indivíduos com alergia ou intolerância à lactose.

Participaram 100 provadores não treinados, os quais receberam as amostras de iogurte e de bebida láctea em cabines individuais, sob luz branca. Cada provador recebeu 30mL de iogurte e 30mL de bebida láctea em copos plásticos transparentes codificados em números com três dígitos, acompanhados de água e bolachas água e sal para a limpeza das papilas gustativas.

A análise sensorial foi feita através de teste afetivo, que avaliou a preferência e aceitação dos consumidores, com escala hedônica verbal estruturada de 9 pontos, obtendo os extremos 1 para desgostei extremamente e 9 para gostei extremamente. Na mesma ficha resposta, foi feito o teste de intenção de compra, sendo 1 para compraria muito frequentemente e 7 para nunca compraria, e intenção de consumo: 1 para comeria sempre e 7 para nunca comeria, ambos com escala verbal estruturada de 7 pontos. (16).

Os dados físico-químicos e sensoriais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e para comparar as médias foi realizado o teste de Tukey assumindo o $p < 0,05$.

RESULTADOS

Os produtos de kefir obtidos pelo método tradicional, usando grãos de kefir de propriedade doméstica e leite de vaca semidesnatado (UHT), atenderam aos requisitos do Codex Alimentarius após fermentação a 25º e armazenamento sob refrigeração. As propriedades físico-químicas e composição microbiana também se mantiveram estáveis ao longo dos 21 dias de armazenamento.

ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

O pH e a acidez mantiveram-se dentro do esperado, variando o pH entre 4,32 e 5,12 para ambos os produtos durante vinte e oito dias (figura 1).

O pH variou entre os produtos nos 0º, 7º, 14º e 21º dias sendo o pH inicial do iogurte significativamente mais baixo ($p < 0,05$) que o da bebida láctea. No 28º dia ambos os produtos apresentaram o mesmo valor de pH. Os valores de acidez em ácido láctico diferiram significativamente entre os dois produtos ($p < 0,05$) no 0º e 14º dias, e não diferiram nos 7º, 21º e 28º dias. Observou-se que no primeiro dia de estocagem, o iogurte encontrava-se com maior teor de ácido láctico e com o pH menor, já a bebida láctea com o pH maior e com menor teor de ácido láctico. Ressalta-se que, durante o armazenamento os produtos apresentaram odor característico de leites fermentados comerciais, e realçaram o odor e aroma da ameixa e da tâmara.

Os valores de proteína diferiram significativamente ($p < 0,05$) sendo 1,63g/100mL na bebida láctea e 2,9g/100mL no iogurte. Enquanto os lipídeos não apresentaram diferença significativa entre os produtos, sendo igual a 0,33g/100mL para o iogurte e 0,43g/100mL para a bebida.

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Os produtos de Kefir mostraram-se microbiologicamente estáveis ao longo de 28 dias de armazenamento sob refrigeração a 7ºC. Tanto o iogurte quanto a bebida láctea estavam dentro dos padrões microbiológicos preconizados para produtos fermentados Instrução Normativa (IN) 46 de 23 de outubro de 2007, IN 16 de 23 de agosto de 2005), conforme descrito na Figura 2.

Percebeu-se estabilidade na quantidade de BALs no iogurte e na bebida láctea ao longo do período de estocagem, os quais se mantiveram em 10^8 UFC/mL. Os grãos de kefir utilizados para a produção apresentaram $1,7 \times 10^7$ /UFC/mL para BALs.

Os resultados das análises que determinam a qualidade higiênico-sanitária mostraram que os produtos de Kefir apresentaram-se adequados. Não foram detectados *Staphylococcus coagulase* positiva, Bactérias psicrotróficas tampouco coliformes, como demonstrado na Tabela 2. As leveduras

apresentaram valores adequados para o iogurte e os grãos (no mínimo 10^4 UFC/mL), porém com um valor abaixo do recomendado na bebida láctea de acordo com a recomendação brasileira para alimentos probióticos (23).

ANÁLISE SENSORIAL

A aceitação global, entre a bebida láctea e o iogurte, não teve diferença sensorial significativa ($p > 0,05$) entre si. O atributo odor também não diferiu entre os produtos lácteos, porém as características: sabor, aparência, cor e textura diferiram significativamente ($p < 0,05$) entre os produtos. A bebida láctea apresentou melhor aceitação quanto ao sabor, e o iogurte quanto a aparência, a cor e a textura. Foram classificados como “gostei ligeiramente” ambos os produtos como pode-se observar na figura 3.

A intenção de consumo e de compra não foi significativamente diferente ($p > 0,05$) entre os produtos lácteos. Em escalas, considerando 7 o máximo para intenção de compra e consumo, obteve-se nota de 3,8 para intenção de compra do iogurte e 4,4 para a bebida, e na intenção de consumo 4 para o iogurte e 4,3 para a bebida láctea. Portanto os consumidores comprariam ambos os produtos lácteos de kefir se estivessem acessíveis, e os consumiriam ocasionalmente.

DISCUSSÃO

O kefir foi produzido a partir da fermentação do leite por grãos de kefir de leite, domésticos. Os grãos de kefir utilizados nesse estudo continham 10^4 UFC/g BALs/g o que é considerado adequado segundo os parâmetros da literatura (2). Tais grãos possuem uma microbiota complexa, tendo as BALs como parte significativa da sua composição microbiana (aproximadamente 60%), mas sabe-se que sua composição é afetada por parâmetros como origem, tipo de substratos, fontes de inóculo e métodos de produção (24).

A concentração de grãos de kefir utilizados como cultura inicial influencia diretamente nas características organolépticas do produto, tais como: viscosidade, cor, aroma e acidez do produto. Neste estudo, utilizou-se 1% de grãos de kefir, bem menos do que em um outro trabalho desenvolvido, onde a concentração que resultou em produtos mais palatáveis foi a de 7% grãos (25). Nesse trabalho, o aumento na concentração de grãos de kefir como cultura iniciadora, diminuiu o pH e aumentou a porcentagem de álcool no produto final. Quanto mais grãos forem utilizados na cultura inicial, mais produtos do metabolismo primário e secundário são produzidos durante as primeiras 24 horas de fermentação. Conforme a lactose vai sendo degradada e fermentada, diminui o sabor adocicado,

aumenta a concentração de ácidos orgânicos, diminui o pH aumentando a coagulação das proteínas do leite, tornando o produto mais viscoso (25).

O número de BALS/g aumentou consideravelmente ao longo do processo de fermentação, atingindo 10^8 UFC/ml de produto e se manteve ao longo do período de armazenamento avaliado, a 7°C. Assim, os produtos de kefir estavam de acordo com a legislação vigente para probióticos (23), que estabelece contagens de bactérias lácticas totais durante o período de validade, de no mínimo 10^7 /g de kefir. Essa estabilidade no número de BALS pode ser atribuída as baixas variações de pH e acidez observadas no final do armazenamento, nos dois produtos, já que grandes alterações tendem a provocar mudança de populações microbianas. Produtos mais ácidos, além de fornecer o sabor característico, inibem o desenvolvimento de microrganismos patogênicos ou mesmo deteriorantes indesejáveis.

A acidez titulável das amostras avaliadas aumentou progressivamente durante os 28 dias de estocagem com valores que variaram de 0,33 a 1,12% de acidez ao final das análises, mostrando que pode ainda haver algum nível de fermentação acontecendo mesmo a baixas temperaturas.

O grau de acidez e pH dos produtos à base de grãos de kefir são resultado do metabolismo fermentativo da lactose, principalmente fermentações láctica, acética e alcoólica, o resultado é um produto de fácil digestão e com alto valor nutricional (26). No início do processo, em temperaturas em torno de 25°C, as BALS são os microrganismos que mais se proliferam e estas realizam a fermentação láctica. São responsáveis pela produção de ácido láctico e proteólise parcial das proteínas do leite, com o acúmulo de aminoácido no meio. Quando em temperatura de refrigeração, entre 5° e 15° C, ocorre a fermentação alcoólica com produção de CO_2 , álcool e aroma característico do produto (26).

Saccharomyces cerevisiae representa a levedura mais comumente isolada e identificada no Kefir. Esta espécie tem alto poder fermentativo e tolerância ao etanol, sua presença contribui para aumentar a qualidade sensorial, promovendo um forte aroma tipicamente fermentado, bem como um sabor refrescante e pungente (27).

Durante a fermentação, o conteúdo de proteínas aumenta enquanto o conteúdo de lactose e ácidos graxos diminui. Essa mudança nas características físico-químicas do produto se deve ao aumento da biomassa microbiana ao longo do período de incubação, a consequente hidrólise da lactose em galactose e glicose, e a hidrólise dos ácidos graxos em ácidos orgânicos como resultado do metabolismo microbiano (26).

O percentual de proteína encontrado nos dois produtos diferiu devido à forma de produção. O iogurte é resultado do processo fermentativo com adição de produtos alimentícios enquanto a bebida láctea é resultado da adição de produtos alimentícios ao soro do Kefir. Assim, o percentual de proteína

encontrado no iogurte é maior, 2,9% e se enquadra na IN 46 de 2007 do Ministério da Agricultura que define como teor mínimo de proteínas para fermentados 2,9% (28). Já, o percentual proteico encontrado na bebida láctea foi, naturalmente menor (1,63%), já que essa foi feita com o soro, e se enquadra na IN 16, de 2005 do Ministério da Agricultura que define que Bebida láctea com adição, deve ter no mínimo 1% de proteína.

Como os dois produtos foram feitos com leite desnatado, era esperado que o teor de lipídeos fosse baixo (0,33g/100mL para o iogurte e 0,43g/100mL para a bebida láctea) sendo abaixo daquele teor preconizado pela IN 16, que é de 2% de matéria gorda.

As tâmaras, ameixas e essência de baunilha foram adicionadas ao iogurte e a bebida láctea com intuito de melhorar as características organolépticas já que não houve adição de açúcar aos produtos resultando em uma aceitação global em torno de 6. Observou-se também que tais aditivos não influenciaram o comportamento da microbiota analisada, bem como a qualidade higiênico-sanitária.

O consumo do Kefir no Brasil tem aumentado devido ao custo-benefício, sendo a principal forma de aquisição para consumo, a doação dos grãos de Kefir doméstico, realizado por meio de repasse em potes ou vidros. Devido a esses diversos repasses, pela forma de armazenamento e métodos de manuseio, os quais não garantem nenhum critério de boas práticas de higiene e manipulação, pode resultar em um produto com composição e qualidade microbiológica alteradas representando riscos à saúde dos consumidores (29).

Várias podem ser as explicações para que os produtos de Kefir mantivessem a qualidade higiênica-sanitária adequada ao longo dos 28 dias de armazenamento.

Primeiramente as boas práticas de fabricação foram seguidas com todos os cuidados, o que garantiu uma cultura sem riscos, tanto à saúde do consumidor quanto à deterioração do produto. Bactérias psicotróficas encontradas nos grãos de kefir não permaneceram viáveis ao longo dos 28 dias de armazenamento. Este resultado pode ser explicado pela competição entre os microrganismos que compõe o kefir, os quais são capazes de inibir ou impedir o crescimento de microrganismos deteriorantes ou patogênicos, não só pela produção de ácidos orgânicos, mas também pela produção de uma série de compostos semelhantes as bacteriocinas. Em condições específicas foram observadas a produção de lactocidina, acidolina, acidofilina, reuterina, búlgaro. Esses produtos podem exercer atividade antimicrobianas contra bactérias Gram negativas e Gram positivas, bem como leveduras, fungos e protozoários, não foi observada a inibição de fungos filamentosos (30).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios a saúde dos probióticos para uso em alimentos, porém ainda não existe critérios estabelecidos para padronizar o cultivo de Kefir e para os repasses entre os indivíduos (31).

CONCLUSÃO

Concluiu-se que a produção doméstica de produtos lácteos a base kefir garante qualidade físico-química e microbiológica desses produtos desde que o mesmo seja produzido seguindo todas as normas de boas práticas de fabricação e armazenado em temperatura adequada de 7°C, por no máximo 28 dias. Usando 1% de grãos de Kefir como cultura inicial, foi possível obter produtos com a quantidade de 10^8 BALS/ml o que é recomendado pela legislação. A análise sensorial foi classificada de modo global como “gostei ligeiramente”, e os consumidores comprariam se estivesse acessível, e consumiriam ocasionalmente ambos os produtos lácteos.

REFERÊNCIAS

1. Weschenfelder S. Elaboração e avaliação físico-química e microbiológica de produtos lácteos obtidos. Tese [Doutorado em Ciência e Tecnologia em Alimentos] Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2016. [Acesso em 1 jul 2022]. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/142254>
2. Organização Mundial de Saúde. ALIMENTARIUS, Codex. Codex standard. Rome, Food Agriculture Organization. WHO; 2011.
3. ROSA, Damiana D. et al. Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. Nutrition research reviews, v. 30, n. 1, p. 82-96, 2017.
4. Tamang J, Shin, DH, Jung SJ, Chae SW. Functional Properties of Microorganisms in Fermented Foods. Frontiers in Microbiology. 2016; 7: p. 578. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00578>
5. BRACCINI, Valéria Pinheiro et al. Leite fermentado: kefir. Brazilian Journal of Development, v. 7, n. 3, p. 21121-21135, 2021.
6. Bourrie B, Willing, B, Cooter P. The Microbiota and Health Promoting Characteristics of the Fermented Beverage Kefir. Frontiers in Microbiology, p. 647, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00647>
7. JOHN, Stephen Moses; DEESEENTHUM, Sirirat. Properties and benefits of kefir-A review. Songklanakarin Journal of Science & Technology, v. 37, n. 3, 2015.
8. FERREIRA, Célia Lúcia de Lucas Fortes. Prebióticos e Probióticos: atualização e prospecção. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 248p. 2012. [Acesso em 1 set 2022].
9. Rocha D, Martins J, Santos T, Moreira A. Labneh with probiotic properties produced from kefir: development and sensory evaluation. Food Sci Tec. 2014;34(4):694-700.
10. Tavares, P. P. L. G., Silva, M. R., Santos, L. F. P., Nunes, I. L. & Magalhães-Guedes, K. T. (2018). Produção de bebida fermentada kefir de quinoa (Chenopodium quinoa) saborizada com cacau (Theobroma cacao) em pó. Rev. Bras. Cienc. Agrar., 13, 1-7.
11. DOS SANTOS CAVARARO, Carollyne et al. Desenvolvimento e aceitação sensorial de kefir com geleia de goiaba e avaliação de compostos bioativos. DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde, v. 13, n. 2, p. 503-515, 2018.
12. Viana R, Magalhães-Guedes K, Dias D, Schwan R. Use of Maldi-Tof MS biosensor in microbial assessment of Brazilian kefir grains. Rev. Ceres. 2019 janeiro/fevereiro; 66. <https://doi.org/10.1590/0034-737X201966010010>
13. Viana R, Magalhães-Guedes K, Júnior R, Dias D, Schwan R. Fermentation process for production of apple-based kefir vinegar: microbiological, chemical and sensory analysis. Braz. J. Microbiol. 2017. jul/set; 48(3). <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.11.006>

14. Bengoa C, Iraporda C, Garrote G, Abraão A. Kefir micro-organisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk. *Journal of Applied Microbiology*. 2018 september 10; 126: p. 686-700. <https://doi.org/10.1111/jam.14107>
15. Cavararo C, Júnior J, Domingues J, Chiappini C. Desenvolvimento e aceitação sensorial de kefir com geleia de goiaba e avaliação de compostos bioativos. *Demetra*. 2018; 13(2): p. 503-515. doi: 10.12957/demetra.2018.31290
16. Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo: ANVISA, 2008.
17. BRASIL. Instrução Normativa Nº 68, DE 12 dezembro de 2006. 2006. Oficializar os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários.
18. Horwitz W, Chichilo P, Reynolds H. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists., 1970.
19. Bligh E, Dyer W. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochemistry Physiological*. 1959; 27: p. 911-917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
20. Silva N, Junqueira V, Silveira N, Santos R, Gomes R. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. Editora Blucher, 2017.
21. BRASIL. Instrução Normativa Nº. 62, de 26 de agosto de 2003. 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água.
22. Downes F, Ito K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th ed. Washington: APHA.; 2001.
23. ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos: lista de alegações de propriedades funcionais aprovadas. Atualizado em julho de 2008.
24. Egea M, Santos D, Filho J, Ores J, Takeuchi K, Lemes A. A review of nondairy kefir products: their characteristics and potential human health benefits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 62, n. 6, p. 1536-1552, 2022. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1844140>
25. Finitrianingsih F, Hafid H, Kimestri A, Sulfitrana A, Toba R. The Effect of Different Kefir Grain Starter Concentration on pH, Alcohol Percentage, and Organoleptic Properties of Ultra High Temperature (UHT) Milk Kefir. *International Conference on Improving Tropical Animal Production for Food Security (ITAPS 2021)*. <https://doi.org/10.2991/absr.k.220309.078>
26. Santos T, Martins J, Rocha D, Moreira A. “Petit suisse” cheese from kefir: an alternative dessert with microorganisms of probiotic activity. *Ciênc Tecnol Alim* 2012;32(3):485-91.
27. Yusriyah N, Agustini DR. The effect of fermentation and concentration of kefir grains of quality of cow's milk kefir. *Journal of chemistry*. 3, 53-57. 2014.

28. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados, de 23 de Outubro de 2007.
29. Ghedini T, Bento L, Miotto L, Oliveira L, Ambrosio M, Martins C, et al. Qualidade microbiológica do kefir. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 1, p. 4336-4349, 2020. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n1-309>
30. Khalid K. An overview of lactic acid bacteria. *Int. J. Biosci*, v. 1, n. 3, p. 1-13, 2011.
31. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada RDC nº 241, de 26 de julho de 2018. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, seção 1, 2.

TABELA 1

Tabela 1. Formulação dos produtos lácteos

Ingredientes	Bebida Láctea	Iogurte
<i>Leite desnatado</i>	200ml	200ml
<i>Leite desnatado com kefir</i>	-	400ml
<i>Soro de leite fermentado</i>	400ml	-
<i>Ameixa seca</i>	6 unidades	6 unidades
<i>Tâmara seca</i>	4 unidades	4 unidades
<i>Essência de baunilha</i>	1 colher de sopa	1 colher de sopa

FIGURA 1

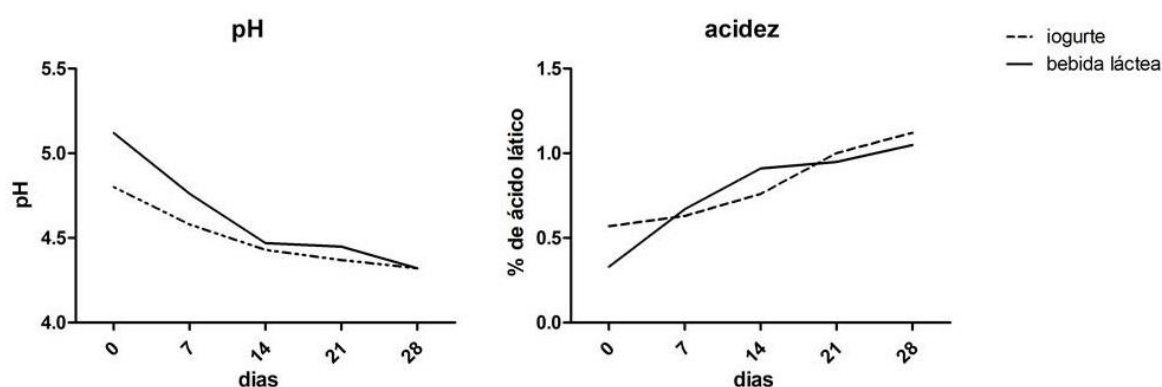


Figura 1. Valores referentes ao pH e acidez em ácido láctico dos produtos lácteos durante o período de estocagem de 28 dias.

FIGURA 2

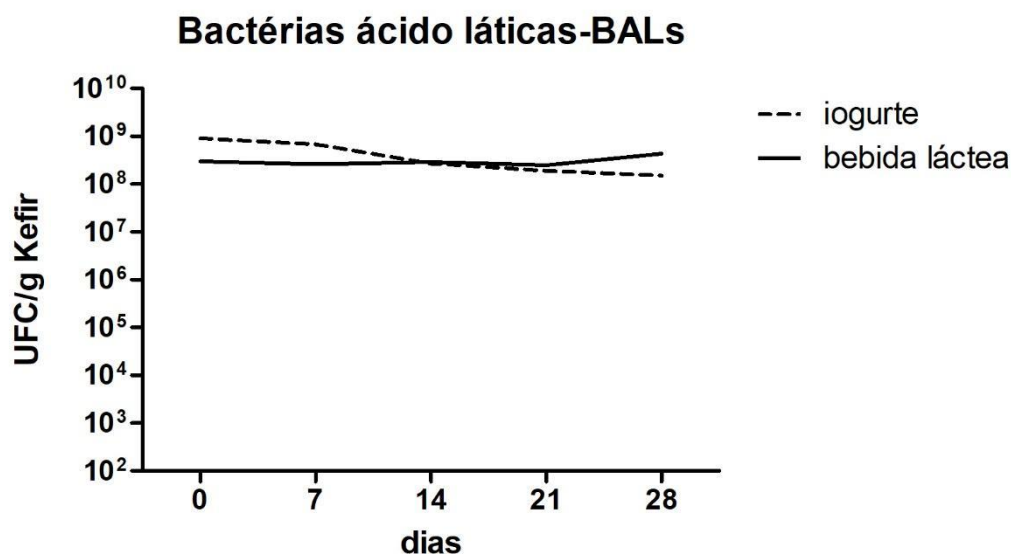


Figura 2. Análise de bactérias ácido lácticas (BAL) nos produtos de kefir durante estocagem.

TABELA 2

Tabela 2- Análises de Bolores e leveduras, *Psicrotróficos*, *Staphylococcus coagulase* positiva, coliformes totais e termotolerantes nos produtos e grãos de kefir.

Análises	Iogurte	Bebida láctea	Grãos
Bolores e leveduras (UFC/mL)	$3,1 \times 10^5$	$6,1 \times 10$	$2,5 \times 10^5$
Psicrotróficos (UFC/mL)	Ausentes	Ausentes	$4,7 \times 10^5$
<i>Staphylococcus coagulase positiva</i> (UFC/mL)	Ausentes	Ausentes	Ausentes
Coliformes totais (NMP/mL)	<3,0	3,6	<3,0
Coliformes termotolerantes (NMP/mL)	<3,0	<3,0	<3,0

FIGURA 3



Figura 3- Resultado da análise sensorial, demonstrando as preferências de diferentes atributos.

Capítulo 3



10.37423/221006704

O PERIGO DAS SUPERFÍCIES INSUSPEITAS, EM UNIDADES DE ATENÇÃO À SAÚDE

DULCINÉA BLUM-MENEZES

Universidade Federal de Pelotas

DANIEL MELLO VIEIRA

Universidade Federal de Pelotas



Resumo: Esta comunicação tem o objetivo de ressaltar a importância de superfícies insuspeitas que, apesar do seu potencial contaminante, são comumente desconsideradas em procedimentos de desinfecção de superfícies realizados em unidades de saúde. A contaminação de superfícies inanimadas ocorre como consequência do depósito de sujidades sobre as mesmas. Como atividade proposta da disciplina de microbiologia, acadêmicos do curso de medicina de universidade pública, no sul do país, realizaram busca ativa em unidades básicas de saúde. Na ocasião, os acadêmicos elegeram, como pontos de coletas microbiológicas, superfícies de objetos e equipamentos de manipulação, rotineira e coletiva, dos profissionais de saúde, presentes naqueles ambientes. A coleta foi realizada sem aviso prévio, no intuito de assegurar a não intervenção dos usuais procedimentos rotineiros de execução da limpeza/desinfecção das unidades investigadas. Os resultados demonstraram crescimento microbiano significativo em superfícies como macas, tampas de frascos, recipientes contendo antissépticos, teclados de computadores, puxadores de gavetas, armários e portas de geladeiras, regulador de nível de mesa ginecológica, além de pastas e prontuários médicos, entre outras.

Devido a contaminação de superfícies insuspeitas, se faz necessária a desinfecção das mesmas, bem como a prática da higienização das mãos, após o contato com qualquer destas áreas possivelmente contaminadas, e, anteriormente ao iniciar os procedimentos que envolvam a manipulação dos pacientes, durante os atendimentos clínicos, ambulatoriais e de enfermagem.

Palavras chave: Ambientes de Instituições de saúde, Atenção à Saúde, Conscientização, Higiene das mãos, Indicadores de contaminação.

A higiene das mãos, realizada pelos profissionais de saúde, constitui a medida mais eficaz e eficiente para prevenir: 1. a transmissão de micro-organismos e infecções associadas à assistência à saúde; 2. a propagação da resistência a agentes antimicrobianos. Este é um procedimento simples, porém ainda hoje tem se observado certa resistência, pelos profissionais de saúde, quanto à frequência de sua execução, durante seus atendimentos.

A presente abordagem não é uma crítica à adesão insuficiente à higienização das mãos, por parte dos profissionais de saúde, mas pretende salientar a importância dos potenciais focos de contaminação, durante os atendimentos clínicos, ambulatoriais e de enfermaria, frente ao seguinte questionamento: -Quão antes seria o momento ideal para a prática da higienização das mãos, pelos profissionais de saúde, durante seus atendimentos?

Preconiza-se que a higienização das mãos, pelos profissionais de saúde ocorra antes de aferir a pressão arterial ou antes da execução de procedimentos que envolvam exames físicos de apalpação. Ou ainda, antes da execução de manobras de auxílio ou condução dos pacientes, como levantar-se do leito. Entretanto, é importante ressaltar que, por um breve descuido, o advérbio “antes” pode se tornar impreciso, quanto a interpretação do exato momento em que a execução da higienização das mãos deva ser realizada.

É necessária a conscientização, pelos profissionais, do risco de contaminação de suas mãos, durante seus atendimentos ao tocarem superfícies, durante as realizações de consultas e exames clínicos, em consultórios, ambulatorios e enfermarias. Portanto, é necessária a higienização das mãos, após o contato com superfícies ambientais.

A preconização constante da limpeza das superfícies em ambientes de atenção à saúde, que apresentam maior índice de contato, como maçanetas de portas, telefones coletivos, interruptores de luz e grades de maca, tem recebido ênfase na contemporaneidade. Porém ressaltamos a importância de outras superfícies, que, apesar do seu potencial contaminante, são comumente insuspeitas.

Consideramos superfícies insuspeitas: tampas de frascos (contendo algodões, gazes, abaixadores de língua, entre outros); recipiente contendo antissépticos tópicos; superfícies de acetos e encostos de macas e poltronas; encontros e braçadeiras de cadeiras; reguladores dos apoios de mesas ginecológicas; escadas para consultórios; puxadores de portas de armários e geladeiras; pastas e prontuários físicos; canetas e outros matérias de anotação; aparelhos celulares; alças de caixas térmicas, utilizadas na unidade ou em visitas domiciliares, entre outras. O contato com estas superfícies oferece importante risco para a qualidade microbiológica das mãos dos profissionais,

justamente por não receberem a devida consideração de seu potencial estado de reservatórios de micro-organismos, não sendo frequentemente considerados como superfícies alvo de procedimentos de desinfecção rotineiras, nas unidades de saúde.

Em nossa experiência, foram realizadas coletas de amostra microbiológica de superfície insuspeitas, sem aviso prévio na unidade, evitando-se que houvesse intervenção no procedimento rotineiro de execução da limpeza/desinfecção realizado pelos profissionais de limpeza, das respectivas unidades investigadas.

Para as coletas, foram utilizados zaragatoas (swabs) estéreis, umedecidas em solução fisiológica estéril, friccionadas vigorosamente sobre superfícies examinadas. O espaço delimitado de superfície para todas as coletas foi de 1 cm², para fins de comparação, entre as amostras. Após as coletas, as zaragatoas, devidamente acondicionadas, foram encaminhadas, sob refrigeração, ao laboratório de microbiologia, para análise.



Figura 1. Montagem ilustrativa relacionando os respectivos pontos de coleta e os isolamentos microbianos, obtido em culturas microbianas (não retrata o local da coleta e sim os respectivos conceitos focais do estudo)

Observou-se expressivo crescimento microbiano em todas as amostras analisadas, demonstrando o risco de possíveis veiculações de micro-organismos, por parte dos profissionais de saúde, durante o atendimento clínico-ambulatorial, através de contato das mesmas, e, posterior manipulação dos pacientes em atendimento.

Sendo assim, faz-se necessária a vigilância de se realizar a prática da higienização das mãos, em momento imediato, que anteceda o contato físico com o paciente. Portanto, caso haja o contato com qualquer tipo de superfície, durante o procedimento, que seja realizado novo procedimento de higienização das mãos, no intuito de assegurar a qualidade microbiológicas das mãos, ou a retirada das luvas de procedimento, em caso de mãos calçadas pelas mesmas. Esta conduta assegurará a segurança microbiológica, durante todas as etapas do atendimento prestado.

As considerações apresentadas pretendem corroborar com a maior compreensão e conscientização das Boas Práticas em Saúde.

BIBLIOGRAFIA

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Higienização das mãos em serviços de saúde/ Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília: Anvisa, 2007.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Segurança do Paciente em Serviços de Saúde: Higienização das Mãos / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2009. 105p.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Segurança do paciente em serviços de saúde: limpeza e desinfecção de superfícies/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília: Anvisa, 2012. p. –118

Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings: Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. MMWR 2002;51

Capítulo 4



10.37423/221006718

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE CYMBOPOGON CITRATUS (DC) STAPF FRENTE À LEVEDURAS DO GÊNERO CANDIDA SP.

Luiz Francisley de Paiva

Universidade do Vale do Sapucaí

Sabrina de Alvarenga Domingues

Universidade do Vale do Sapucaí



Resumo: *Candida* sp. é um gênero de levedura que faz parte da microbiota do corpo humano e de animais. É considerado o principal grupo de fungos patógenos oportunistas. O uso de plantas medicinais é empregado cada vez mais nas diversas áreas. A planta *Cymbopogon citratus* (DC). Stapf é popularmente conhecida no Brasil por Capim-cheiroso, Capim-cidreira, Capim-santo, Capim-limão, Capim-cidrô, Capim-cidrão. Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* frente a leveduras do gênero *Candida* sp. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação das folhas pelo método do arraste a vapor. A atividade antifúngica foi verificada pelas técnicas de disco-difusão, concentração inibitória mínima e concentração letal mínima. Foram utilizadas as cepas padrão ATCC de *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida Krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida utilis*. O óleo essencial apresentou atividade antifúngica frente a todas as espécies. A faixa de inibição varia de 0,281 µg/mL a 1,125 µg/mL e concentração letal varia de 0,562 µg/mL a 1,125 µg/mL. Esses achados contribuem para um futuro emprego da planta *C. citratus* como fitoterápico em tratamento preventivo ou alternativo contra infecções fúngicas.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Fitoterapia. *Cymbopogon*. *Candida* sp.

INTRODUÇÃO

O gênero *Candida* sp. é constituído por aproximadamente 200 espécies e faz parte da microbiota do corpo humano e de animais, sendo pouco mais de vinte espécies responsáveis por infecções ao homem. É considerado o principal grupo de fungos patógenos oportunistas^[1-3]. Estas leveduras são agentes causadores de diferentes tipos de infecções na cavidade bucal onde a candidíase é a infecção fúngica mais comum neste sítio e apresenta-se como: candidíase oral atrófica, candidíase oral hiperplástica e candidíase oral pseudomembranosa^[4,3,5]. Pacientes imunocomprometidos, portadores de HIV e diabéticos são mais susceptíveis a candidíase. Também são frequentemente encontrados em idosos, crianças na primeira infância e pacientes que fazem uso prolongado de antibióticos^[6,7]. Em pacientes portadores de HIV, o desenvolvimento da candidíase orofaríngea ocorre em mais de 90% dos pacientes em algum momento da evolução da doença^[8].

O tratamento de candidíase é realizado através da prescrição de antifúngicos entre os quais a nistatina e o miconazol aparecem como os mais utilizados em tratamento tópico. Em relação ao tratamento sistêmico, o fluconazol e o itraconazol são os fármacos de primeira escolha, porém, há muitos relatos de efeitos indesejados pelos pacientes^[5]. A maioria dos antifúngicos disponíveis no mercado e que são utilizados no tratamento da candidíase possui toxicidade grave, podendo incluir especialmente a nefrotoxicidade, que é o mais observado^[9]. Assim sendo, há uma grande urgência de novas substâncias menos nocivas e mais eficazes as quais, destacasse o emprego de fitoterápicos como uma alternativa terapêutica^[10].

A espécie de *Cymbopogon citratus* (DC). Stapf pertencente à família Poaceae e é originária da Índia. É uma erva perene, ereta, medindo aproximadamente 0,60-2 metros de altura com folhas esverdeadas, aromáticas, estreitas, longas, paralelinérveas partindo da base (nervuras foliares paralelas entre si). Popularmente conhecida no Brasil, entre outras denominações, por Capim-cheiroso, Capim-cidreira, Capim-santo, Capim-limão, Capim-cidrô, Capim-cidrão^[11]. Tradicionalmente, suas folhas são consumidas pela população na forma de chá ou infusão devido aos seus efeitos antimicrobianos, anti-inflamatório, antiproliferativo de células tumorais e, também, pelo auxílio na cura de feridas, cólicas, má digestão, dentre outros. Essa espécie possui, também, efeitos: antitérmico, antiespasmódico e diurético, antiparasitário, antisséptico bucal, antitussígeno e até mesmo contra tuberculose. Ainda, estudos evidenciam que essa planta tem se mostrado como^[12,13] um eficiente bactericida e antifúngico para várias espécies de *Candida* sp.^[14-16]. Esta planta produz metabólitos secundários chamados de óleos essenciais (OE), que podem inibir ou retardar o crescimento de microrganismos, atenuando

muitos dos efeitos colaterais encontrados em drogas sintéticas^[17]. Essas propriedades tornam *C. citratus* uma espécie potencialmente benéfica para uso na área de cuidados da saúde^[12,13].

Este estudo tem como objetivo avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de *C. citratus* frente a leveduras do gênero *Candida* sp. pelos métodos de disco-difusão em ágar, concentração inibitória mínima e concentração letal mínima.

MATERIAIS E MÉTODOS

OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

As folhas de *C. citratus* foram coletadas de plantas adultas localizadas no viveiro de plantas do curso de Ciências Biológicas da Universidade do Vale do Sapucaí (Univás) (-22.219737, -45.914720) no período matutino do mês de setembro de 2018. A planta foi identificada utilizando critérios macroscópicos e organolépticos como odor característico de citral e sabor cítrico de acordo com a Farmacopeia Brasileira^[18] junto ao Herbário UNIVÁS da mesma universidade pelo curador F. S. Braz e teve uma exsicata depositada sob o número de tombo UNIVAS-002.

Imediatamente após a coleta do material vegetal, foram utilizados 25 g das folhas frescas em três repetições para determinar o teor de umidade pelo método gravimétrico de acordo com a metodologia proposta por Rocha et al. ^[19]. As amostras foram pesadas antes e durante a incubação em estufa a temperatura de $103 \pm 2^\circ\text{C}$. O tempo de incubação foi interrompido após o peso da amostra não sofrer variação de até 0,001 g em balança analítica.

EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação das folhas pelo método do arraste a vapor em aparelho do tipo Clevenger, conforme a Farmacopeia Brasileira^[18] no Laboratório de Pesquisas Básicas da UNIVÁS.

Inicialmente as folhas foram secas em temperatura ambiente por uma semana e em seguida moídas em um triturador. Após esse processo, 500 g do material vegetal seco foram colocados em um balão volumétrico de 6000 mL e acrescentado água destilada na proporção de 1:10. O tempo de extração foi de 4 horas.

A leitura do volume de óleo essencial extraído foi feita diretamente na escala volumétrica do tubo separador. Em seguida, o óleo foi coletado e seco com pequenas quantidades de sulfato de sódio anidro. Posteriormente, o óleo seco foi transferido para um picnômetro pré-calibrado o qual foi

calculada a densidade relativa sendo a razão da massa da amostra pelo volume. O rendimento do óleo essencial foi calculado com base na matéria seca de acordo com Santos et al. [20], pela seguinte fórmula: $RO (\%) = VO \times DR / (Bm - (Bm \times U / 100)) \times 100$, sendo RO = Rendimento do óleo (%), VO = Volume do óleo, DR = Densidade relativa, Bm = Biomassa vegetal, U = Teor de umidade (%).

O óleo foi armazenado para a realização dos testes em tubo estéril cor âmbar a temperatura de 4 a 8°C lugar sem a incidência direta de luz.

MICROORGANISMOS UTILIZADOS E PADRONIZAÇÃO DOS INÓCULOS

Foram utilizadas cepas referências de: *Candida albicans* ATCC90028, *Candida dubliniensis* CBS7987, *Candida tropicalis* ATCC750, *Candida glabrata* MYA 2950, *Candida Krusei* ATCC6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida utilis* ATCC9950.

As cepas foram reativadas em Ágar Sabouraud Dextrose, incubados a 37°C durante 24 horas. Em seguida, um pequeno fragmento das colônias foi colocado em uma solução de salina 0,9%. A suspensão resultante foi homogeneizada em agitador de vórtex durante cerca de 30 segundos. A turbidez foi ajustada ao tubo 0,5 da escala de McFarland com auxílio de um espectrofotômetro (CELM E-225 D) com absorvância de 625 nm. Este procedimento foi realizado de forma a fornecer uma suspensão-padrão de levedura contendo 1×10^6 a 5×10^6 CFC/mL (CLSI, 2009).

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA POR DISCO-DIFUSÃO

A atividade antifúngica do óleo essencial de *C. citratus* foi realizada pela técnica de disco-difusão de acordo com a metodologia de Kirby-Bauer seguindo o documento M44-A2^[21] com modificações. Foram utilizados discos de papel de filtro Whatman Nº 1 de 6 mm de diâmetro estéreis. O meio de cultura utilizado foi o Ágar Mueller-Hinton (HIMEDIA) suplementado com 2% de glicose e 0,5 µg/mL de azul de metileno. Aproximadamente 25 mL do meio foram dispensados em placas de Petri de 90 mm de diâmetro com a finalidade de obter uma profundidade padronizada de aproximadamente 4 mm igualmente em todas as placas.

Com auxílio de um swab estéril embebido na suspensão fúngica, o inóculo foi espalhado sobre toda a superfície do meio. As placas ficaram 5 minutos entreabertas para a secagem e após esse período, foi colocado no centro de cada placa, um disco de papel de filtro estéril. Em seguida, foi dispensado sobre cada disco, um volume de 5 µL do óleo essencial.

A atividade do óleo essencial foi verificada em 5 concentrações diferentes diluídas em DMSO (v/v) em: 10%, 25%, 50%, 75% e sem diluição (100%). Cada placa recebeu um disco com uma amostra do óleo,

e o teste foi realizado em sextuplicatas. As placas foram incubadas a 35°C por 24-48 horas e após esse período, os halos foram mensurados com auxílio de um paquímetro.

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA – CIM

A concentração inibitória mínima do óleo essencial foi determinada de acordo com a norma M27-A2^[22] com modificações. O meio utilizado foi o RPMI-1640 com L-glutamina e glicose sem bicarbonato de sódio tamponado com 0,165 M de MOPS. O pH foi ajustado para 7.0 com NaOH 1 N.

Em um tubo de vidro estéril foram adicionados 0,8 mL do óleo essencial; 0,05 mL de polissorbato Tween® 80 e 4,2 mL do meio de cultura RPMI-1640 sendo esta concentração correspondente a 16%. O tubo foi agitado durante 5 minutos em agitador tipo vórtex e em seguida, utilizando o procedimento de diluição seriada (1:1) realizou-se uma série de diluições em meio RPMI-1640 no qual foram obtidas 10 soluções com concentrações decrescentes. A faixa da concentração testada foi de 4% a 0,003%^[23]. A suspensão fúngica foi padronizada a 0,5 na escala de McFarland, e em seguida diluída em 1:50 seguida de outra diluição de 1:20 em meio líquido RPMI-1640, correspondendo à 1×10^3 a 5×10^3 CFC/mL.

A CIM foi realizada em placas de microdiluição de 96 poços, com fundo em “U” (estéril), para onde foram transferidos para as colunas de 1 a 10, 100 µL das soluções de óleo essencial nas concentrações decrescente. Com exceção da coluna 11, foram adicionados 100 µL do inóculo em todos os poços. A coluna 11 recebeu 200 µL de meio sem óleo e sem inóculo sendo este o controle de esterilidade e a coluna 12 recebeu 100 µL de meio sem óleo e posteriormente os 100 µL do inóculo sendo estes o padrão de crescimento positivo. O volume final na placa de microdiluição foi de 200 µL, resultando em uma concentração final do inóculo de $0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$ CFC/mL. As placas foram vedadas com papel adesivo Contact® e incubadas a 35°C por 24-48 horas. Após esse período, foram adicionados 20 µL de Cloreto de Trifenil Tetrazólio (TTC) a 2% a cada poço, corante que promove a coloração das colônias sem comprometer sua viabilidade e as placas foram reincubadas por mais 2 horas. Os poços que apresentam atividade antifúngica permanecem incolores, enquanto os poços os quais houve crescimento microbiano coram-se em vermelho. A CIM foi determinada como a menor concentração do óleo essencial que não demonstra crescimento microbiano visível.

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO LETAL MÍNIMA – CLM

Antes da adição do indicador TTC nas microplacas, 10 µL de cada poço foram inoculados em meio Ágar Sabouraud Dextrose (HIMEDIA) e incubados a 35°C durante 24-48 horas. A concentração letal mínima

é a concentração de um antimicrobiano que leva à morte de um microrganismo e será definida como a concentração de óleo mais baixa capaz de matar a totalidade das células^[24].

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos nas avaliações de difusão em ágar foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias das medidas dos halos comparadas pelo teste Tukey, ambos a 5% de significância, utilizando-se o Software R. 2.5.1 e pela correlação de Pearson utilizando o software MiniTab 18.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *C. CITRATUS*

O óleo essencial extraído exibiu uma coloração amarelada com aparência límpida e apresentou uma densidade de 0,881 g/mL estando abaixo de 0,957 g/mL encontrados por Santos et al.^[25], porém, o rendimento da extração de 0,93% encontrada neste estudo está dentro da faixa de 0,465% a 1,18% encontrado por esses mesmos autores. Figueiredo et al.^[26], ao analisar a influências de diversos reguladores vegetais no rendimento dos óleos essenciais extraídos num período de um ano, observou uma variação de 0,21% (verão) à 0,40% (inverno). Nos trabalhos de Costa et al.^[27], o valor observado foi de 0,46%. Diversos fatores influenciam no seu rendimento. Essa diferença ressalta Gomes e Negrelle^[28], pode ser explicada devido aos fatores tais como: temperatura, condições da colheita, método de extração, solo e material utilizado como folhas secas ou frescas. Sobre este assunto, Santos et al.^[20] chama a atenção para o método que utiliza biomassa livre de umidade (BLU). Trata-se de um método que utiliza material vegetal seco, desidratado. É um método que pode ser repetido a qualquer momento e sem que haja desvios significativos.

ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Neste estudo, as cepas testadas demonstraram-se susceptível ao óleo essencial de *C. citratus* pelo método de disco-difusão como mostra a **TABELA 1**. Por este método foi possível verificar a atividade antifúngica sobre todas as espécies testadas com valores de halos que variam de 25,33 mm a 44,5 mm.

TABELA 1: Diâmetro do halo de inibição do óleo essencial de *C. citratus* frente às leveduras.

Microrganismo	Concentração do óleo essencial					Pearson
	100%	75%	50%	25%	10%	
<i>Candida dubliniensis</i>	44,5	32,08	25,5	13,5	10	0,98
<i>Candida utilis</i>	37,5	31,17	23,83	14	10,83	0,99
<i>Candida albicans</i>	33,5	27,16	21	13,58	11,17	0,99
<i>Candida glabrata</i>	32	26,83	21,75	16,67	12,08	0,99
<i>Candida tropicalis</i>	30,5	24,33	18,33	12,5	9,67	0,99
<i>Candida parapsilosis</i>	29,83	24,67	21,33	14,33	11	0,98
<i>Candida krusei</i>	25,33	22,67	18,67	14	10,33	0,98

*Diâmetros expressos em milímetros.

A correlação de Pearson nas 5 concentrações testadas em todos os microrganismos foi acima de 0,98. A linearidade é conceituada como a capacidade do método em produzir resultados proporcionais à concentração da solução testada dentro de um intervalo. Valores mais próximos de 1 significam uma correlação positiva perfeita entre as duas variáveis.

Embora o maior halo de inibição formado na presença de óleo essencial puro seja pertencente à espécie *C. dubliniensis* (**FIGURA 1**), ao analisar as médias pelo teste de Tukey, não houve diferença estatística entre outros halos com valor de $p = 0,108$. Na **FIGURA 2** estão apresentados os resultados das médias dos halos de inibição.

FIGURA 1: Halo de inibição da espécie *Candida dubliniensis* frente ao óleo essencial de *C. citratus*.

Nos testes de concentração inibitória mínima, a atividade inibitória do óleo essencial ocorreu em todas as cepas de leveduras testadas, como demonstrado na **TABELA 2**. A faixa de inibição ocorreu entre 0,281 µg/mL a 1,125 µg/mL enquanto que a concentração letal foi de 0,562 µg/mL a 1,125 µg/mL.

FIGURA 2: Média dos diâmetros dos halos de inibição (mm) de espécies de *Candida* sp. frente ao óleo essencial de *C. citratus*. ($p = 0,108$).

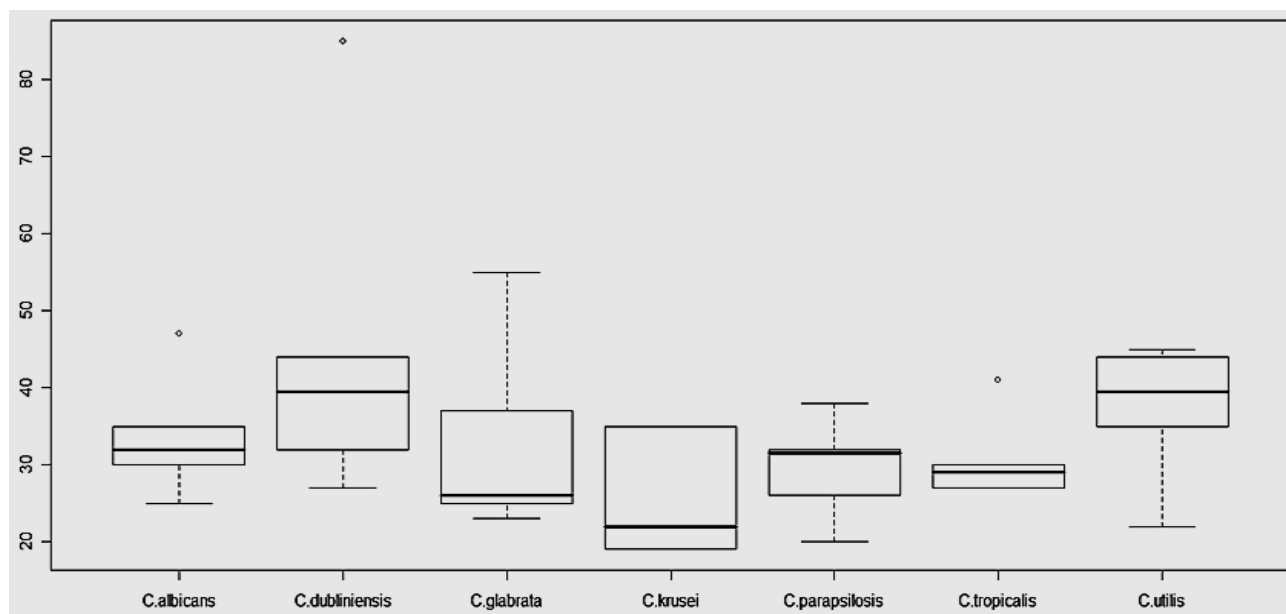


TABELA 2: Valores da concentração inibitória mínima e concentração letal mínima.

Microrganismos	CIM	CLM
<i>Candida krusei</i>	0,281 µg/mL	0,562 µg/mL
<i>Candida albicans</i>	0,562 µg/mL	1,125 µg/mL
<i>Candida dubliniensis</i>	0,562 µg/mL	1,125 µg/mL
<i>Candida tropicalis</i>	0,562 µg/mL	1,125 µg/mL
<i>Candida glabrata</i>	0,562 µg/mL	1,125 µg/mL
<i>Candida utilis</i>	0,562 µg/mL	1,125 µg/mL
<i>Candida parapsilosis</i>	1,125 µg/mL	1,125 µg/mL

Em um estudo realizado por Cortez et al.^[29], a CIM foi igual 0,125 µg/mL para as cepas *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Valores inferiores aos encontrados neste estudo. Entretanto, Santos et al.^[25] encontrou CIM de 0,640 mg/mL para *C. albicans* e 1,250 mg/mL para *C. tropicalis*, sendo o último um valor consideravelmente maior de inibição embora foram utilizadas cepas decorrentes de candidíase vulvovaginal.

A utilização do óleo essencial de *C. citratus* apresentou melhor resultado sob a cepa de *C. krusei* tendo essa o valor de CIM de 0,281 µg/mL e o menor resultado apresentado foi sob a cepa de *C. parapsilosis* com valor de 1,125 µg/mL.

No estudo de Leite et al.^[30], os resultados obtidos apontaram para uma significativa ação antifúngica do óleo essencial de *C. citratus* contra espécies de *Candida* sp. Para Sookto et al.^[31], os compostos terpênicos encontrados no óleo essencial de *C. citratus* interagem com os compostos lipídicos na estrutura celular interferindo assim na biossíntese da parede celular das células fúngicas.

O presente trabalho aponta uma alternativa à necessidade de novas opções terapêuticas para candidíase. Ainda há a necessidade de que novos estudos sejam realizados a fim de avaliar e garantir a eficácia do óleo essencial de *C. citratus* frente a cepas variáveis e a possível interação com diferentes antimicrobianos.

A fitoterapia representa a possibilidade de ampliação de opções terapêuticas. Para Hasenclever et al.^[32], constitui importante fonte de inovação em saúde e pode fortalecer ainda mais a inovação, a produção e exploração da rica biodiversidade brasileira. O estudo da fitoterapia vem sendo realizados nos mais diversos biomas brasileiros ressaltam Bettega et al.^[33]. O uso de plantas medicinais é empregado cada vez mais nas diversas áreas. Para Abílio e colaboradores^[6], a fitoterapia é economicamente viável, diminui as reações adversas, apresenta eficácia e está se tornando um meio terapêutico promissor.

CONCLUSÃO

O método de extração de óleo essencial por arraste a vapor em aparelho tipo Clevenger utilizando biomassa seca demonstrou resultado de rendimento satisfatório. O óleo essencial de *C. citratus* possui propriedades inibitórias e letais aos fungos do gênero *Candida* sp. Esses achados contribuem para um futuro emprego da planta *C. citratus* como fitoterápico em tratamento preventivo ou alternativo contra infecções fúngicas.

REFERÊNCIAS

- 1.Negri M, Martins M, Henriques M, Svidzinski TIE, Azeredo J, Oliveira R. Examination of potential virulence factor of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. *Mycopathologia*. 2010; 169: 175-82. ISSN 1573-0832. [CrossRef].
- 2.Abrantes MR, Lima EO, Medeiros MAP, Menezes CP, Guerra FQS, Milan EP. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre leveduras *Candida* não albicans. *Rev Bras Farm*. 2013; 94(3): 227-33. ISSN 2176-0667. [Link].
- 3.Peixoto JV, Rocha MG, Nascimento RTL, Moreira VV, Kashiwabara TGB. Candidíase – Uma revisão de literatura. *BJSCR*. 2014; 8(2): 75-82. ISSN 2317-4404 [Link].
- 4.Hernández-Solís SE, Reuda-Gordillo F, Rojas-Herrera RA. Actividad de la proteinasa en cepas de *Candida albicans* aisladas de la cavidad oral de pacientes inmunodeprimidos, con candidiasis oral y sujetos sanos. *Rev Iberoamer Micol*. 2014; 31(2): 137-40. ISSN 1130-1406. [CrossRef].
5. Simões RJ, Fonseca P, Figueira MH. Infecções por *Candida* spp. na cavidade oral. *Rev Odont Clínico-Cient*. 2013; 12(1): 19-22. ISSN 1677-3888. [Link].
- 6.Abílio F, Maria V, Silva BM, Silva ED, Carvalho FVQ, Macêdo A et al. Actividad antifúngica de productos naturales indicados por vendedores de hierbas (raizeiros) para el tratamiento de la candidiasis oral. *Rev Cub Estomatol*. 2014; 51(3): 259-69. ISSN 0034-7507. [Link].
- 7.Gavanji S, Larki B. Comparative effect of propolis of honey bee and some herbal extracts on *Candida Albicans*. *Chi J Integ Med*. 2015; 23(3): 1-7. ISSN 1993-0402. [CrossRef].
- 8.Li X, Lei L, Tan D, Jiang L, Zeng X, Dan H et al. Oropharyngeal *Candida* colonization in human immunodeficiency virus infected patients. *Acta Path Microbiol Imm Scand*. 2013; 121(5): 375-402. ISSN 1600-0463. [CrossRef].
- 9.França FD, Ferreira AF, Lara RC, Rossoni JR JV, Costa DC, Moraes KC et al. Alteration in cellular viability, pro-inflammatory cytokines and nitric oxide production in nephrotoxicity generation by Amphotericin B: involvement of PKA pathway signaling. *J Applied Toxicol*. 2014; 34(12): 1285-92. ISSN 1099-1263. [CrossRef].
- 10.Mesa-Arango AC, Bueno SJG, Betancur-Galvis LA. Productos naturales con actividad antimicótica. *Rev Esp Quimiot*. 2004; 17(4): 325-331. ISSN 0214-3429. [Link].
- 11.Lorenzi H, Matos FJA. Plantas Medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2002, 544 pp. ISBN 8586714186.
- 12.Almeida RBA, Akisue G, Cardoso LML, Junqueira JC, Jorge AOC. Antimicrobial activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. on *Staphylococcus* spp., *Streptococcus mutans* and *Candida* spp. *Rev Bras Pl Med*. 2013; 15(4): 474-82. ISSN 1516-0572. [Link].
- 13.Boukhatem MN, Ferhat MA, Kameli A, Saidi F, Kebir HT. Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. *Libyan J Medic*. 2014; 9(1): 25431. ISSN 1819-6357. [CrossRef].

14. Castro LO, Ramos RLD. Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais: *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., capim-cidrô, *Cymbopogon martinii* (Rox.) J.F. Watson, palma-rosa, *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, citronela, *Elyonurus candidus* (Trin.) Hack., capim-limão, *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash, vetiver. Porto Alegre: FEPAGRO, 2002. 31 p. (Boletim FEPAGRO, 11). ISSN 0104-9089. [Link].
15. Mohamad S, Ismail NN, Parumasivam T, Ibrahim P, Osman H, A Wahab H. Antituberculosis activity, phytochemical identification of *Costus speciosus* (J. Koenig) Sm., *Cymbopogon citratus* (DC. Ex Nees) Stapf., and *Tabernaemontana coronaria* (L.) Willd. and their effects on the growth kinetics and cellular integrity of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. BMC - Evidence-Based Compl Alter Medic. 2018; 18(1): 5. ISSN 1472-6882. [CrossRef].
16. Khan MSA, Ahmad I. Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. J Ethnopharmacol. 2012; 140(2): 416-23. ISSN 1872-7573. [CrossRef].
17. Swamy MK, Akhtar MS, Sinniah UR. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. Evidence-Based Compl Alter Medic. 2016; Article ID 3012462, p.1-21. ISSN 1741-4288. [CrossRef].
18. Brasil. Agência Nacional de Vigilância sanitária - ANVISA. Farmacopeia Brasileira: vol. 2. 5ª ed. Brasília: Ed. MS, 2010. ISBN 978-85-88233-41-6.
19. Rocha RP, Melo EC, Demuner AJ, Radünz LL, Braun H. Effect of drying air velocity on the quality of essential oil From Lemon grass. Gl Sci Technol. 2012; 5(1): 23-31. ISSN 1984 – 3801. [Link].
20. Santos AS, Alves SM, Baker D, Rocha Neto O. Descrição de sistema e métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2004. 6p. ISSN 1517-2244. [Link].
21. Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeast; approved guideline - 2nd ed. CLSI document M44-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2009. ISBN 1-56238-703-0.
22. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard, 2nd ed. NCCLS document M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA. 2002. ISBN 1-56238-469-4.
23. Lima IO, Oliveira RAG, Lima EO, Farias NMP, Souza EL. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. Rev Bras Farmacogn. 2006; 16(2):197-201. ISSN 0102-695X. [Link].
24. Cantón E, Penám J, Vludes A, Quindós G, Gobernado M. Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species. Diagn Microbiol Infec Dis. 2003; 45: 203-206. ISSN 0732-8893. [CrossRef].
25. Santos A, Paduan RH, Gazin ZC, Jacomassi ED, Oliveira OS, Cortez DAG, et al. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC). Rev Bras Farmacog. 2009; 19(2): 436-41. ISSN 1981-528X. [CrossRef].

- 26.Figueiredo RO, Delachiave MEA, Ming LC. Reguladores vegetais na produção de biomassa e teor de óleos essenciais em *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., em diferentes épocas do ano. Rev Bras Pl Med. 2006; 8(3): 31-35. ISSN 1983-084X. [Link].
- 27.Costa CARA, Bidinotto LT, Takahira RK, Salvadori MFD, Barbisan LF, Costa M. Cholesterol reduction and lack of genotoxic or toxic effects in mice after repeated 21-day oral intake of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil. Food Chem Toxicol. 2011; 49: 2268-2272. ISSN 1873-6351. [CrossRef].
- 28.Gomes EC, Negrelle RRB. Análise da cadeia produtiva do capim limão: estudo de caso. Rev Bras Pl Med. 2015; 17(2): 201-9. ISSN 1516-0572. [CrossRef].
- 29.Cortez LER, Yamaguchi MU, Cortez DAG, Pesco DCS. Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae) e *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (Poaceae). O Mundo da saúde. 2015; 39(4): 433-40. ISSN 1980-3990. [CrossRef].
- 30.Leite MCA, Bezerra APB, Sousa JP, Guerra FQS, Lima EO. Evaluation of Antifungal Activity and Mechanism of Action of Citral against *Candida albicans*. Evidence-Based Compl Alter Medic. 2014; 11: 1-9. ISSN 1741427X. [CrossRef].
- 31.Sookto T, Srithavaj T, Thaweboon S, Thaweboon B, Shrestha B. In vitro effects of *Salvia officinalis* L. essential oil on *Candida albicans*. Asian Pacific J Trop Biomed. 2013; 3(5): 376-380. ISSN 2221-1691. [CrossRef].
- 32.Hasenclever L, Paranhos J, Costa CR, Cunha G, Vieira D. A indústria de fitoterápicos brasileira: desafios e oportunidades. Ciên Saúde Colet. 2017; 22(8): 2559-69. ISSN 1678-4561. [CrossRef].
33. Bettega PVC, Czulniak GR, Piva R, Namba EL, Ribas CR, Grégio AMT et al. Fitoterapia: dos canteiros ao balcão da farmácia. Arch Oral Res. 2011; 7(1): 89-97. ISSN 2236-8035 [Link].

Capítulo 5



10.37423/221006719

PENDIMETHALIN BIODEGRADATION BY SOIL STRAINS OF BURKHOLDERIA SP. AND METHYLOBACTERIUM RADIOTOLERANS

MATHEUS I.S. SANTOS

Universidade Federal de Sergipe

MARCUS V.A. BATISTA

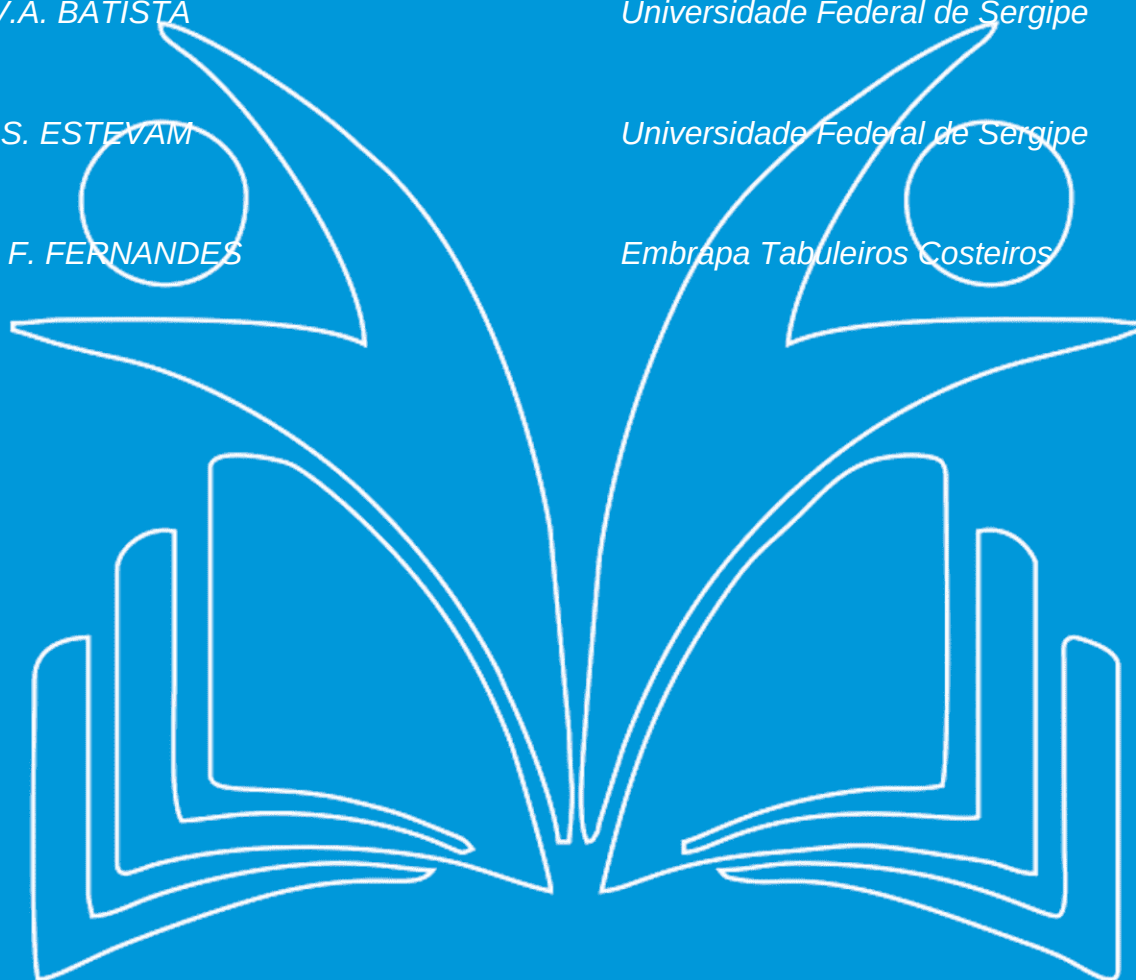
Universidade Federal de Sergipe

CHARLES S. ESTEVAM

Universidade Federal de Sergipe

MARCELO F. FERNANDES

Embrapa Tabuleiros Costeiros



Abstract: Pendimethalin herbicide is widely used and persists in the environment as a contaminant causing negative impacts, including for human health. Microorganisms have the capacity to remove many contaminants from the environment. Thus, the aim of this work was to evaluate the efficiency of soil bacterial species prospected by molecular modelling of cytochrome P450 in to degrade pendimethalin. Strains of *Burkholderia* sp. and *Methylobacterium radiotolerans* were cultivated in a mineral saline medium enriched with 281 mg/L pendimethalin (MSPEN) and another containing glucose 1.0 g/L as extra carbon source (MSPENGLI). Both strains were able to degrade pendimethalin under the two conditions experienced. *Burkholderia* sp. F7G4PR33-4 was more efficient in degrading 65% of the herbicide in MSPEN medium, with 49.3% in MSPENGLI; while *Methylobacterium radiotolerans* A6A1PR46-4 degraded 55.4% in MSPEN and 29.8% in MSPENGLI mediums. These findings contribute to the expansion of knowledge on the competence of isolates of these two bacterial genera in degrading herbicidal xenobiotics and biotechnological potential for pendimethalin degradation and bioremediation.

Key words: bioremediation, *Burkholderia*, *Methylobacterium radiotolerans*, pendimethalin biodegradation.

INTRODUCTION

The microbial process of transformation is considered as the major or sometimes the only means by which pesticides are eliminated from a variety of ecosystems. Microorganisms have the capacity to remove many contaminants from the environment by a diversity of enzymatic processes, many of them can be catalyzed by cytochrome P450 (CYP450) (Lovley 2003, Bernhardt 2006).

The widespread use and long persistence of dinitroaniline herbicides have resulted in their frequent detection in soil, groundwater and surface water, and these herbicides cause negative impacts on the environment. Pendimethalin is classified by the US Environmental Protection Agency (EPA) as a possible human carcinogen, and has been classified as a persistent bioaccumulative toxin (Hou et al. 2006, Roca et al. 2009, Huang et al. 2016).

Pendimethalin (3,4-dimethyl-2,6-dinitro- N-pentan-3-ylaniline) is an efficient selective herbicide from dinitroaniline class globally registered under several trade names, three in the Brazil, and used as selective herbicide recommended for pre-emergence weed control in acacia, cotton, garlic, peanut, rice, potato, coffee, sugarcane, onion, eucalyptus, beans, tobacco, corn, pine, soy and wheat crops (AGROFIT/MAPA, Kole et al. 1994, Ni et al. 2016). Pendimethalin acts by disrupting mitosis in the meristematic cells of seedling plants by inhibiting the formation of microtubules (Strachan & Hess 1983, Mitra & Sept 2006). It is one of the two most widely used herbicide and the most used selective herbicide in the world with persistence in soil, reaching almost three years (Belden et al. 2003, Huang et al. 2016, Chen et al. 2021). Therefore, it is of interest the discovery of new efficient microorganisms for biodegradation of herbicides applicable in the bioremediation of contaminated areas.

In a previous study (Santos et al. in press) of molecular modeling to prospect for bacteria with potential for biodegradation of pendimethalin based on their affinity for CYP450, species of the *Burkholderia* and *Methylobacterium* genera are presented as potential biodegraders of this herbicide. Thus, this study objected to evaluate the efficiency of *Burkholderia* sp. and *Methylobacterium radiotolerans* soil isolates to degrade pendimethalin.

MATERIALS AND METHODS

CHEMICALS

Pendimethalin (3,4-dimethyl-2,6-dinitro-N- pentan-3-ylaniline) standard was obtained from Sigma-Aldrich (Germany). Dichloromethane HPLC-grade was obtained from JT Baker (United States). All other chemicals were of analytical grade.

BACTERIAL STRAINS

Burkholderia sp. F7 G4PR33- 4 and *Methylobacterium radiotolerans* A6A1PR46-4 strains from the bacterial collection from the Laboratory of Soil Microbiology of the Embrapa Tabuleiros Costeiros - Brazil were evaluated for their ability to degrade and use pendimethalin as the sole carbon source.

CULTURE CONDITIONS AND MEDIA

Luria Bertani (LB) medium (per liter): sodium chloride, 5 g; tryptone, 5 g; yeast extract, 2.5 g. LB medium was used to prepare the bacterial inoculum. Mineral saline (MS) medium [per liter of 20 mM phosphate buffer [(KH₂PO₄, Na₂HPO₄) pH 7.21]: Ca (NO₃)₂·4H₂O, 0.6 g; FeSO₄·7H₂O, 0.2 g; MnSO₄·4H₂O, 0.02 g; ZnSO₄·7H₂O, 0.02 g; CuSO₄·5H₂O, 0.04 g; H₃BO₃, 0.003 mg; NaMoO₄·2H₂O, 0.004 mg; conc. H₂SO₄, 1 mL; MgSO₄, 0.2 g (Kröckel & Focht 1987). Glucose, tested as additional carbon source in an additional simultaneous culture, was added at final concentration of 1.0 g/L and ammonium sulfate at 0.5 g/L. The concentration of pendimethalin as carbon source in the culture media was 281 mg/L (1 mM).

The replicated cultures were grown aerobically in 125 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of liquid medium in a rotary shaker at 120 rpm and 30° C. *Burkholderia* sp. F7G4PR33-4 and *Methylobacterium radiotolerans* A6A1PR46-4 strains were pre-inoculated in LB medium and incubated until the mid-exponential phase was reached after 12 h of culture (OD_{600 nm} 0.5). After growth, cells from each flask were harvested by centrifugation at 5.000 g and the pellet was washed with 20 mM phosphate buffer to eliminate medium residues. Cells were resuspended in fresh MS with an adjusted density of 6.0×10^8 CFU/mL. An aliquot of the cell suspension (1% V/V) was added into 50 mL of MS 281 mg/L pendimethalin (MSPEN) and MS 281 mg/L pendimethalin plus glucose 1.0 g/L (MSPENGLI) mediums for analysis of pendimethalin biodegradation at 0, 4, 6, 10, 20 and 30 days of incubation. Bacterial growth was monitored based on the colony forming units (CFU/mL). Another non inoculated flasks containing 50 mL of MS 281 mg/L pendimethalin and 281 mg/L pendimethalin plus glucose 1.0 g/L media set was prepared for abiotic control.

Extraction of pendimethalin from the cultures The disappearance of pendimethalin was monitored by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Therefore, aliquots of 1 mL from the cultures of each bacteria media were added to 10 mL with deionized water and extracted 3 times with 10 mL of dichloromethane, always collecting the lower organic phase. The organic layer was dried with

anhydrous sodium sulfate and concentrated in rotary evaporator at 45 °C. The concentrated material was recovered in dichloromethane and transferred into a vial and kept in 1.0 mL of the solvent.

BIODEGRADATION ANALYSIS

The chromatographic analyses of pendimethalin biodegradation were performed using a Shimadzu GC-MS QP2010Plus quadrupole gas chromatograph (Kyoto, Japan). A 30 m×0.25 mm NST 05-MS fused-silica capillary column with a film thickness of 0.25 mm obtained from Agilent was used. Helium (purity≥99.999%) was used as a carrier gas at a flow rate of 0.98 mL/ min. A 1 µL extract was injected in a splitless mode at an injection temperature of 280° C. The oven temperature was programmed to increase from an initial temperature of 60° C (held for 1min), increased to 100° C with ramp of 25° C/ min, then the temperature was raised to 250° C with ramp of 15° C/min, for ramp from 20° C to 300° C (held for 5min). The temperatures of the ion source and mass-selective detector interface were 260 and 300° C, respectively. The GC–MS system was operated in the selected- ion monitoring (SIM) mode with the electron multiplier tune value. The electron multiplier voltage for pendimethalin was set to 200V relative to the tune value. The 252 quantitative ion was monitored.

STATISTICAL ANALYSIS

Microsoft Excel (2016) was used for data analysis. To assess the statistical differences from groups, the Tukey's multiple range tests and one-way ANOVA were used at probability of 0.05 or less was considered significant.

RESULTS

Solubility of pendimethalin in dichloromethane and water is >800 g/L (20° C) and 0.33 g/L (20° C), respectively. In this system, the low water-solubility of the pendimethalin enables to remove any co-extractives which are also soluble in water. The extraction method used only 1.0 mL of the sample, gave overall recoveries in the MS medium samples ranged from 83 to 120%, compared to the analytical standard at the same concentration in dichloromethane. This liquid-liquid extraction method employed in combination with the optimized chromatographic protocol for detection of pendimethalin residue from cultures resulted in the adequate preparations for quantification of degradation (Figure 1).

There were significant differences ($p < 0.05$) between the levels of pendimethalin at different culture conditions compared with the abiotic control (Table I). The results for *Burkholderia* sp. F7G4PR33-4

ability to degrade pendimethalin are illustrated in Figure 2. It is shown that in the MSPEN treatment the strain F7G4PR33-4 could degrade about $24.94 \pm 4.77\%$ of pendimethalin within 10 days of incubation, and $65.03 \pm 13.04\%$ pendimethalin within 30 days of incubation, with an accentuation in activity and increase in cell density from day 10. However, in the MSPENGLI treatment, the decrease in the concentration of pendimethalin was observed only from day 20, which reached $49.35 \pm 7.78\%$ after 30 days, even with a small decrease in cell density.

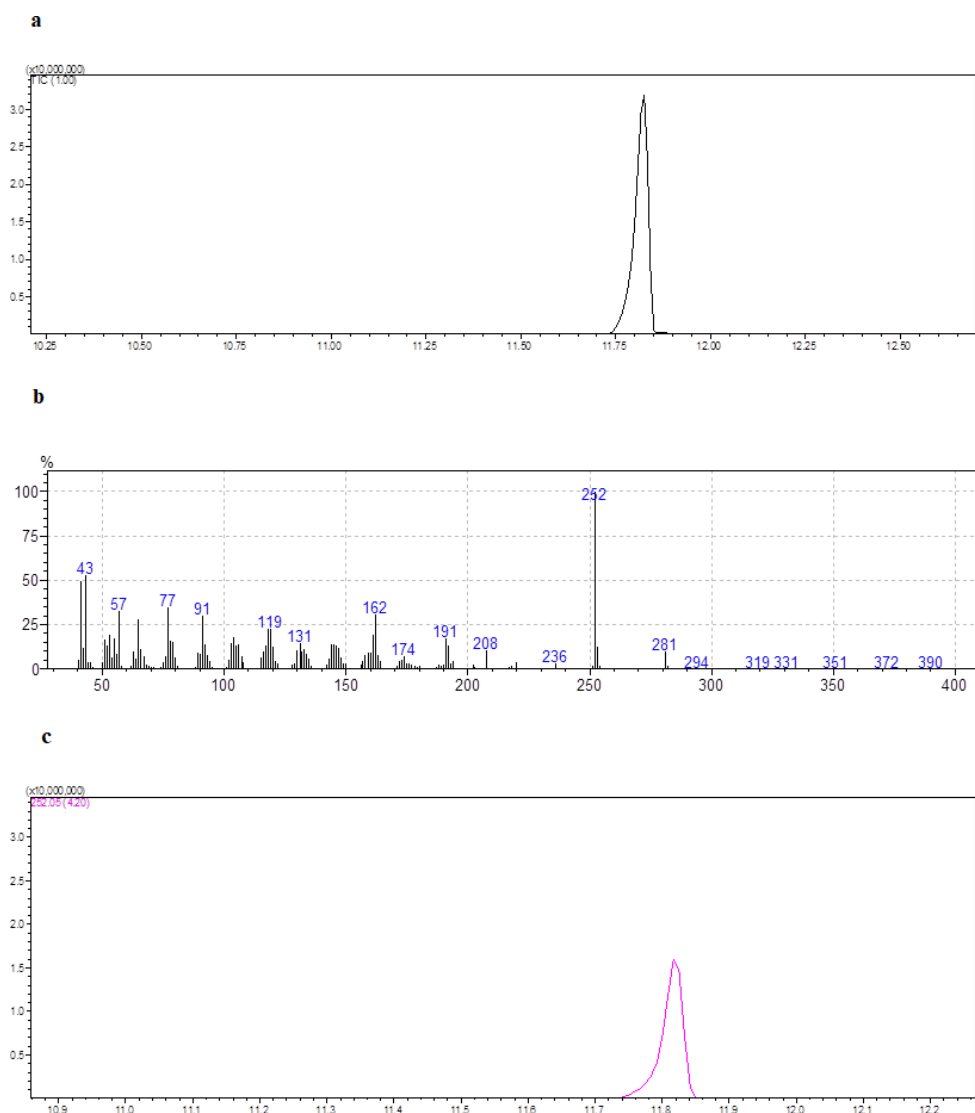


Figure 1. Chromatogram of optimized method (a) and mass spectra (b) of the pendimethalin fragmentation by

GC-MS showing structures of the molecular ion (281) and ion 252. Peak of the 252 ion used for quantification (c).

For *M. radiotolerans* A6A1PR46-4 ability to degrade pendimethalin the results are in Figure 3. It's shown that in the MSPEN treatment the strain A6A1PR46-4 could degrade about $8.46 \pm 2.11\%$ of

pendimethalin within 10 days of incubation, and $55.46 \pm 2.54\%$ pendimethalin within 30 days; and as for *Burkholderia* sp. F7G4PR33-4, a marked decrease concentration and increase in cell density was observed from day 10. In the MSPENGLI treatment, the decrease in the concentration of pendimethalin was observed only from day 20, which reached only $29.82 \pm 5.4\%$ in 30 days, with an increase in cell density.

Evaluation of the pendimethalin loss by volatilization in the abiotic control media, also by CG-MS, showed that in 30 days there was a decrease in the concentration of $5.53 \pm 4.76\%$ and $4.83 \pm 4.74\%$ in the MSPEN and MSPENGLI media, respectively.

Table I. Concentration of Pendimethalin (mg/ml) following incubation with the bacteria strains in two mineral salt mediums and abiotic degradation controls after 30 days of culture.

Bacterial strains	Culture condition				
	MSPEN	MSPENGLI	ABIOTIC MSPEN	ABIOTIC MSPENGLI	MSD
	Mean $\pm$ S standard deviation				
<i>M. radiotolerans</i> A6A1PR46-4	$126.33^a \pm 3.21$	$203^b \pm 10.81$	$265.33^c \pm 12.01$	$269^c \pm 12.76$	22.16
<i>Burkholderia</i> sp. F7G4PR33-4	$97.66^a \pm 12.74$	$143^b \pm 11.13$	$265.33^c \pm 12.01$	$269^c \pm 12.76$	22.95

Means followed with the same letter in the same row are not significantly different at $p < 0.05$ according to MSD (minimal significant difference).

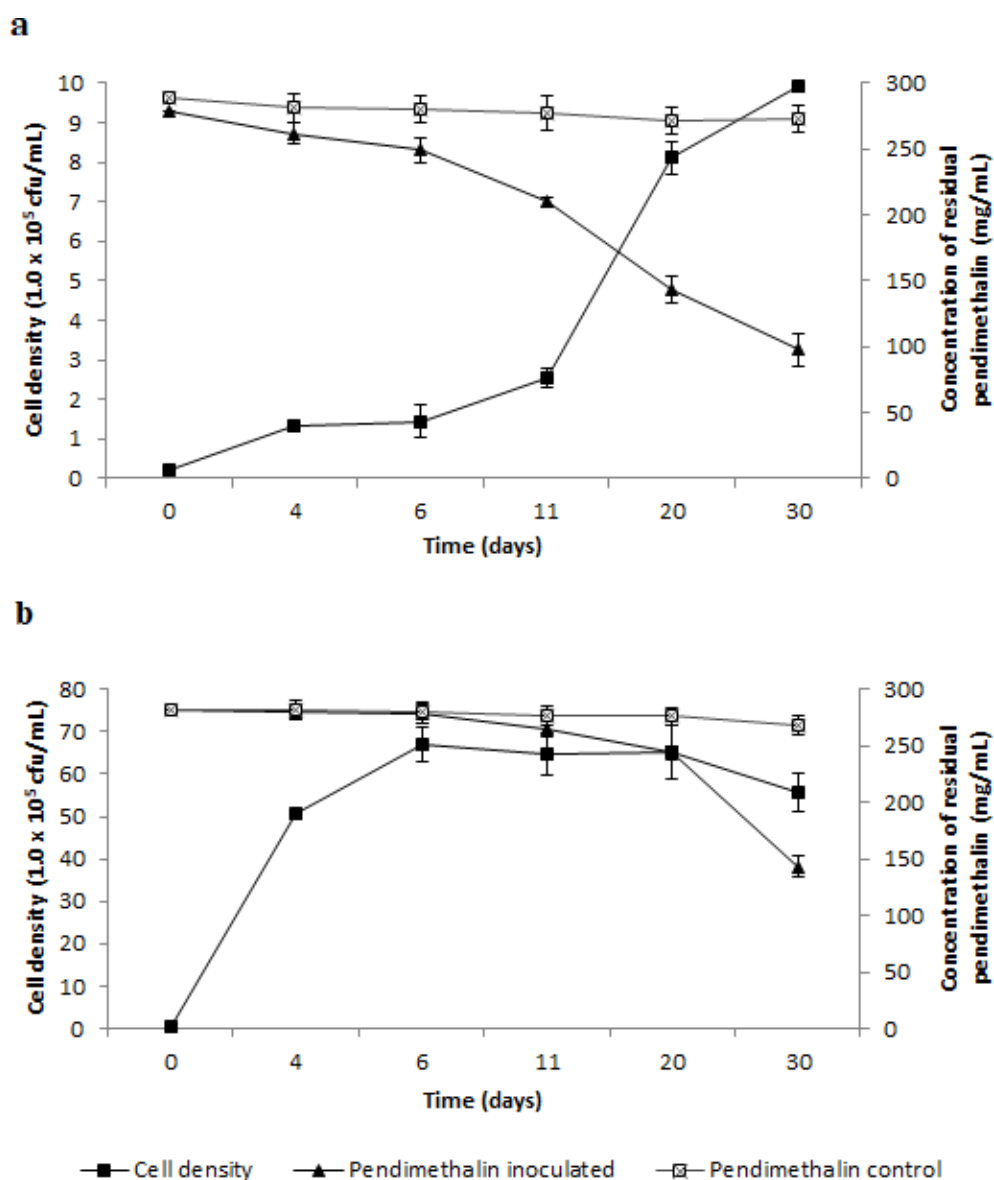


Figure 2. Biodegradation of pendimethalin by *Burkholderia* sp. F7G4PR33-4 strain in MSPEN (a) and MSPENGLI (b) mediums.

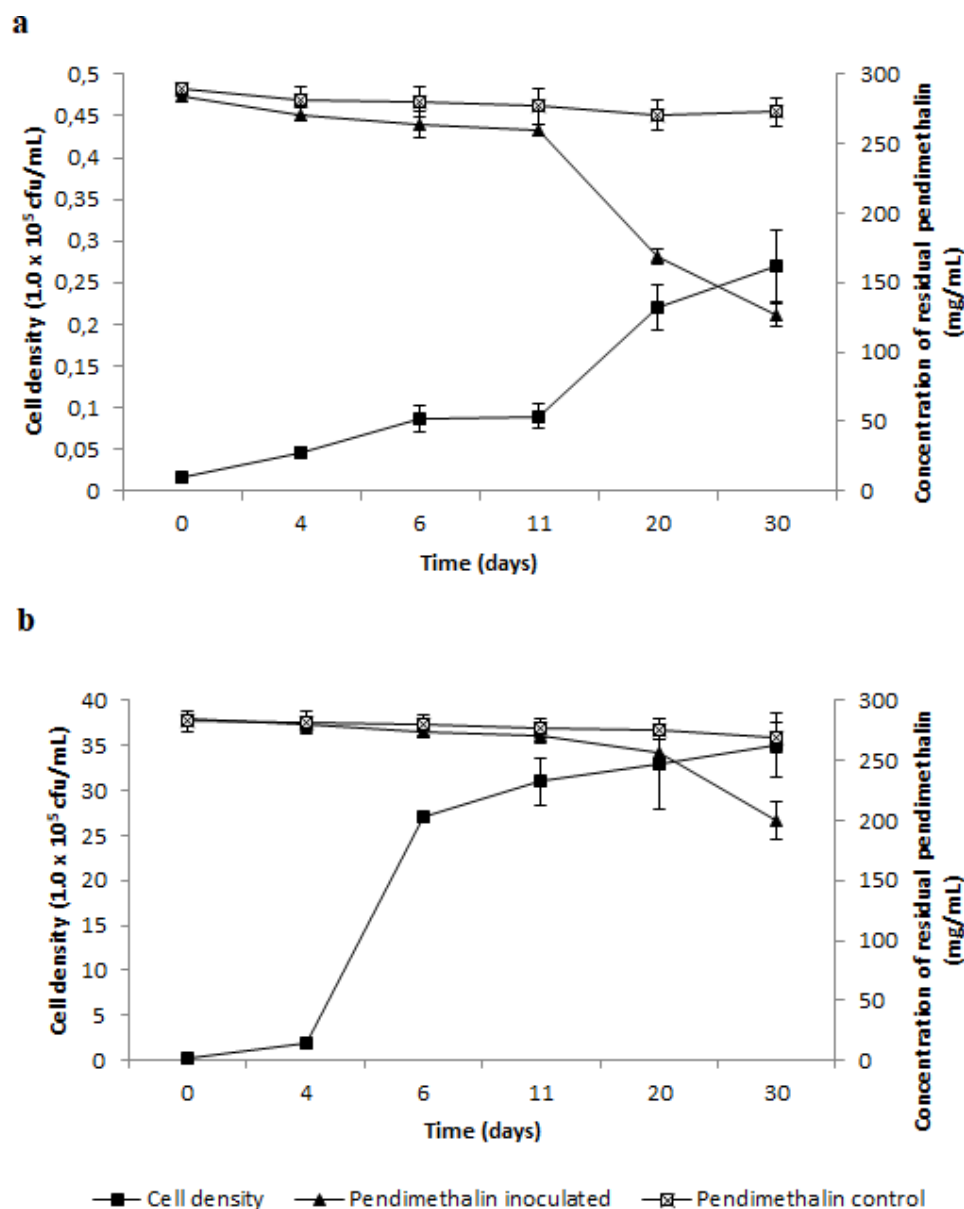


Figure 3. Biodegradation of pendimethalin by *Methylobacterium radiotolerans*

A6A1PR46-4 strain in MSPEN (a) and MSPENGLI (b) mediums.

DISCUSSION

Burkholderia and *Methylobacterium* genera are members of the phylum Proteobacteria, respectively of the orders Burkholderiales and Rhizobiales, mainly found in soils and diverse parts of plants, including root-nodulating nitrogen-fixing symbiosis (Lidstrom & Chistoserdova 2002). Some strains with potential biotechnological application in bioremediation have been reported for degradation of recalcitrant xenobiotics, including pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) and polychlorinated biphenyls (PCBs) compounds (Coenye & Vandamme 2003, Liang et al. 2014, Javaid et

al. 2016, Onder Erguven et al. 2021). However, to date there has been no record of pendimethalin biodegradation by isolates of these two bacterial genera.

CYP450 from species of *Burkholderia* and *Methylobacterium* genera, previously studied for their theoretical affinity to pendimethalin (unpublished data), presented quali-quantitative similarities in interaction with the herbicidal compound in relation to that observed for human CYP1A1, which confers pendimethalin resistance in transgenic rice plant (Kawahigashi et al. 2007). Therefore, the decision to evaluate the degradability of pendimethalin by strains of the *Burkholderia* and *Methylobacterium* based on the theoretical affinity of their CYP450 with the herbicide was then correct, since cytochromes P450 are responsible for oxidation reactions in xenobiotics (Bernhardt 2006). In addition, Kole et al. (1994), Megadi et al. (2010) and Ni et al. (2016) reported the microbial pendimethalin degradation by oxidative N-dealkylation and nitroreduction, these reactions being of CYP450 competence.

Pendimethalin concentration of 281 mg/L, or 1 mM, applied in this study is in the intermediate range of the recommended for xenobiotic biodegradation studies (Focht 1994) and for those reported in previous studies by Sato et al. (1990) and Kole et al. (1994), that used respectively, 5 and 500 ppm. This concentration is still above 200 mg/L pendimethalin used by Ni et al. (2018) for degradation of pendimethalin by *Paracoccus* sp. P13, as well as 180 mg/L of pendimethalin tolerated by strains M-1 and LSMR-1 of *Rhizobium leguminosarum* and *Stenotrophomonas maltophilia* RB-3 under *in vitro* culture conditions performed by Singh & Singh (2020); which is higher than its residue concentration in the environment and has typically been used in biodegradation.

The biodegradation rates presented by isolates *Burkholderia* sp. F7G4PR33-4 and *M. radiotolerans* A6A1PR46-4 in the MSPEN medium are higher than those presented by Kole et al. (1994), which observed that 45% and 55% metabolism of pendimethalin caused by *Azotobacter chroococcum* after 10 and 20 days of incubation, respectively. Megadi et al. (2010) and Ni et al. (2016) reported efficiency of *Bacillus circulans* and *Bacillus subtilis* Y3 for >99% of pendimethalin degradation, even though the latter used a concentration almost three times lower than that of the present study.

In general, the behavior of the two strains was similar, since both showed greater degradation activity in the MSPEN medium with pendimethalin as the only source of carbon and energy to grow, although *Burkholderia* sp. F7G4PR33-4 had a hundred fold higher cell density than *M. radiotolerans* A6A1PR46-4. On the other hand, we observed a rapid increase in cell density for the two strains in the MSPENGLI medium with a decrease in the concentration of pendimethalin only near the end of the observation

period, probably due to the phenomenon of biphasic catabolism, or diauxie, enhanced in its genetic bases by Traxler et al. (2006); where glucose is preferably used by cells.

CONCLUSIONS

The present study have shown that *Burkholderia* sp. F7G 4PR33-4 and *Methylobacterium radiotolerans* A6A1PR46-4 were able to degrade pendimethalin and use it as the sole carbon source to grow in in vitro culture conditions. These findings contribute to the expansion of knowledge on the competence of isolates of these two bacterial genera in degrading herbicidal xenobiotics and biotechnological potential for pendimethalin biodegradation and bioremediation.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Embrapa Tabuleiros Costeiros for providing the bacterial strains and laboratory support, and the Brazilian Institutes Fundação de Apoio à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe - FAPITEC/SE [grant number 8444.UNI332.22122.17102013/2013-02 (PPSUS Sergipe)]; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq [grant number 446425/2014-1]; and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES [grant number 23038.010050/2013-04] for financial support.

REFERENCES

- BELDEN JB, PHILLIPS TA, HENDERSON KL, CLARK BW, LYDY MJ & COATS JR. 2003. Persistence, mobility, and bioavailability of pendimethalin and trifluralin in soil. In: Coats Jr & Yamamoto H (Eds), *Environmental Fate and Effects of Pesticides*, Ames, p. 167-177.
- BERNHARDT R. 2006. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J Biotechnol* 124: 128-145.
- CHEN J, YU Q, PATTERSON E, SAYER C & POWLES S. 2021. Dinitroaniline Herbicide Resistance and Mechanisms in Weeds. *Front Plant Sci* 12: 634018.
- COENYE T & VANDAMME P. 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol* 5: 719-729.
- FOCHT DD. 1994. Microbiological procedures for biodegradation research. In: Weaver RW, Angle JS & Bottomley PS (Eds), *Methods of Soil Analysis: Part 2— Microbiological and Biochemical Properties*, 5th ed., SSSA Book Series, Madison, p. 407-426.
- HOU L ET AL. 2006. Pendimethalin exposure and cancer incidence among pesticide applicators. *Epidemiology* 17: 302-307.
- HUANG X ET AL. 2016. Microbial catabolism of chemical herbicides: microbial resources, metabolic pathways and catabolic genes. *Pestic Biochem Phys* 143: 272-297.
- JAVAID MK, ASHIQ M & TAHIR M. 2016. Potential of biological agents in decontamination of agricultural soil. *Scientifica*, 2016.
- KAWAHIGASHI H, HIROSE S, OHKAWA H & OHKAWA Y. 2007. Herbicide resistance of transgenic rice plants expressing human CYP1A1. *Biotechnol Adv* 25: 75-84.
- KOLE RK, SAHA J, PAL S, CHAUDHURI S & CHOWDHURY A. 1994. Bacterial degradation of the herbicide pendimethalin and activity evaluation of its metabolites. *B Environ Contam Tox* 52: 779-786.
- KRÖCKEL L & FOCHT DD. 1987. Construction of chlorobenzene utilizing recombinants by progenitive manifestation of rare event. *Appl Environ Microb* 53: 2470-2475.
- LIANG Y, MEGGO R, HU D, SCHNOOR JL & MATTES TE. 2014. Enhanced polychlorinated biphenyl removal in a switchgrass rhizosphere by bioaugmentation with *Burkholderia xenovorans* LB400. *Ecol Eng* 71: 215-222.
- LIDSTROM ME & CHISTOSERDOVA L. 2002. Plants in the pink: cytokinin production by *methylobacterium*. *J Bacteriol* 184: 1818.
- LOVLEY DR. 2003. Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. *Nat Rev Microbiol* 1: 35-44.
- MEGADI VB, TALLUR PN, HOSKERI RS, MULLA SI & NINNEKAR HZ. 2010. Biodegradation of pendimethalin by *Bacillus circulans*. *Indian J Biotechnol* 9: 173-177.

- MITRA A & SEPT D. 2006. Binding and interaction of dinitroanilines with apicomplexan and kinetoplastid alpha-tubulin. *J Med Chem* 49: 5226-5231.
- NI H, LI N, QIU J, CHEN Q & HE J. 2018. Biodegradation of Pendimethalin by *Paracoccus* sp. P13. *Current microbiology* 75: 1077-1083.
- NI H, YAO L, LI N, CAO Q, DAI C, ZHANG J, HE Q & HE J. 2016. Biodegradation of pendimethalin by *Bacillus subtilis* Y3. *J Environ Sci* 41: 121-127.
- ONDER ERGUVEN G, TATAR Ş, SERDAR O & YILDIRIM NC. 2021. Evaluation of the efficiency of chlorpyrifos-ethyl remediation by *Methylobacterium radiotolerans* and *Microbacterium arthrosphaerae* using response of some biochemical biomarkers. *Environ Sci Pollut Res* 28: 2871-2879.
- ROCA E, D'ERRICO E, IZZO A, STRUMIA S, ESPOSITO A & FIORENTINO A. 2009. In vitro saprotrophic basidiomycetes tolerance to pendimethalin. *Int Biodeterior Biodegrad* 63: 182-186.
- SANTOS MIS, SANTOS ALP, ARAÚJO SS, SANTOS E, BRANDÃO ECTA, FERNANDES MF, ALEXANDRE MR, ESTEVAM CS & BATISTA MVA. In press. Bacterial cytochrome P450 for dinitroaniline herbicides degradation: biotechnological potential for bioremediation. *Braz J Microbiol*.
- SATO Y, SATO M & SUZUKI T. 1990. Degradation of pendimethalin by bacteria isolated from soil. *J Weed Sci Tech* 35: 61-67.
- SINGH R & SINGH G. 2020. Effect of pendimethalin and imazethapyr on the development of microorganisms in vitro and at field conditions. *Toxicol Environ Chem* 102: 439-454.
- STRACHAN SD & HESS FD. 1983. The biochemical mechanism of action of the dinitroaniline herbicide oryzalin. *Pestic Biochem Phys* 20: 141-150.
- TRAXLER MF, CHANG DE & CONWAY T. 2006. Guanosine 3',5'-bispyrophosphate coordinates global gene expression during glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli*. *P Natl Acad Sci Usa* 103: 2374-2379.

Capítulo 6

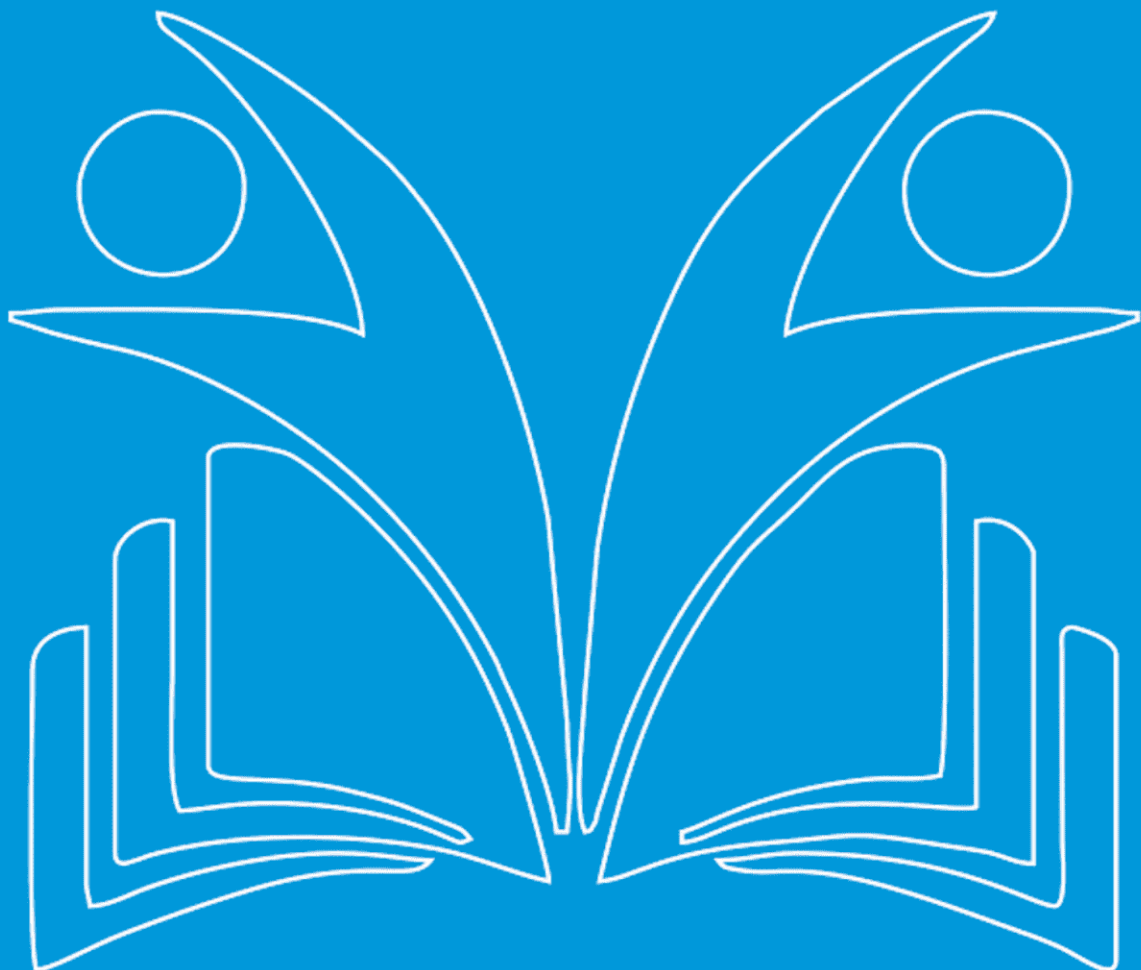


10.37423/221006727

UTILIZAÇÃO DE BANCO DE DADOS DE DNA NA RESOLUÇÃO DE CRIMES E O PAPEL DO FARMACÊUTICO

Thacianna Santos de Sousa

Faculdade LS



Resumo: O DNA tem sido o principal responsável por uma revolução nas técnicas de identificação humana nos últimos anos. Dentre essas técnicas, os marcadores moleculares fornecem uma nova estratégia de aplicação nas atividades forenses. Associados à área forense, avanços na informática e tecnologia têm permitido o uso de ferramentas computacionais pela polícia, a fim de aperfeiçoar a elucidação de crimes resultando em um volume muito grande de dados e por isso, existe a necessidade de armazenamento dessas informações por meio dos bancos de DNA. Contudo, os bancos de dados levantam discussões importantes sobre leis e direitos que merecem ser analisadas. Este artigo visou verificar a utilização dos bancos de dados de DNA na resolução de crimes e identificação de indivíduos e o papel do farmacêutico como perito criminal. Foi realizada uma pesquisa utilizando os descritores: DNA, investigação criminal, farmacêutico e banco de dados. As bases de dados utilizadas foram: Scielo e Pubmed, no período de 04 de abril de 2018 até 01 de maio de 2020. Os dados coletados foram em português e inglês. A utilização dos bancos de dados em perfis genéticos tem se mostrado eficiente como apoio na área forense. Adicionalmente, é de suma importância o papel do profissional farmacêutico como perito criminal para atender a demanda nas análises periciais utilizando seus conhecimentos técnicos.

Palavras-chave: Banco de dados. Perfis genéticos. DNA. Elucidações de crimes. Farmacêutico forense.

1 INTRODUÇÃO

Cada ser humano possui um perfil genético único que o diferencia de todos os outros. Esse perfil diferenciado de cada indivíduo permite identificar sua cadeia genética, determinar a genealogia de um grupo familiar além de conferir sua identificação civil.

Entende-se por código genético a relação entre a sequência de proteínas e os genes (pedaços de DNA) que as originam em um ser vivo (BRASIL, 2012). Para análise e diferenciação da cadeia genética de cada indivíduo, são identificados fragmentos de DNA os quais são como código de barras individualizados, exceto em gêmeos monozigóticos (gêmeos idênticos/ univitelinos). Essa análise de DNA pode ser realizada por meio da coleta de amostra de saliva, unhas, ossos, cabelo, dente e demais tecidos ou fluidos do organismo a ser analisado (BRASIL, 2012).

São vastas as utilidades dessa ferramenta de análise de DNA, como sua ajuda ao longo dos tempos para identificação de pessoas desaparecidas, ancestralidade e parentesco, além de identificar possíveis suspeitos que cometeram crimes. Para que tais identificações sejam confirmadas, compara-se a identidade do material encontrado com o material genético em bancos de DNA. (SILVA, 2014).

Os Estados Unidos foram percussores na criação de banco de DNA. Os pesquisadores tinham como objetivo principal a identificação civil de soldados mortos e perdidos, na operação Tempestade no Deserto com o Iraque em 1990. O projeto se mostrou eficaz em 1994 quando finalmente implementado com características diferentes conforme a legislação dos municípios para a coleta das evidências encontradas e o tipo de crime, já que nem para todos os delitos era necessária investigação. Posteriormente à prática nos EUA, os britânicos implementaram os bancos de DNA com o diferencial da unificação entre todos os estados, onde esse pudesse ser acessado por todos os municípios independentemente da localização do crime (PENA, 2005). Atualmente, países utilizam a técnica de análise de DNA como importante ferramenta para solução de crimes, como: Estados Unidos, Canadá e Alemanha, alguns outros países tem interesse na implementação do programa como: Cuba, Chile e Uruguai (BONARCCOSO, 2010).

No Brasil, em 2012 a Lei nº 12.654 foi aprovada pelo Congresso Nacional visando a implementação dos bancos de dados de DNA para identificação de possíveis criminosos (BRASIL, 2012). Com o acordo firmado com *Federal Bureau of Investigation* (FBI), foi autorizada a utilização do *National DNA Index System* conhecido como também NDIS, o qual baseia-se no CODIS, *software* que permite comparar e analisar as amostras em um curto espaço de tempo (BRASIL, 2012).

Na legislação brasileira são caracterizados dois momentos para coleta do material: o primeiro é baseado na identificação do indivíduo e o segundo momento é quando há obrigatoriedade da coleta do material genético para se ter um perfil genético para futuras elucidações de crime (BRASIL, 2012). O art. 9-A da Lei 7.210/84, se refere à obrigatoriedade da coleta do material para inclusão no banco de dados genéticos quando os suspeitos praticaram modalidades dolosas como estupro, assassinatos, crimes hediondos ou com violência, deixando brechas para crimes brandos como: roubos, sequestro entre outros (BRASIL, 2012).

No Reino Unido, a legislação vigente obriga que o código genético seja incluído no banco de dados por qualquer infração (ALBARELLOS, 2009).

De acordo com o Decreto nº 7.950/ 2013, a importação dos dados genéticos para à Rede Integrada de Bancos de Perfil Genéticos (RIBPG) permite o intercâmbio de perfis genéticos para outros estados brasileiros, sendo 19 bancos estaduais e 1 banco nacional, totalizando 8.255 perfis genéticos cadastrados encontrados na vítima, locais de crimes ou em elementos condenados. Esses perfis genéticos já contribuíram para explanação de pelo menos 436 investigações em todo o Brasil (BRASIL, 2012).

O percussor no Brasil do banco de DNA para investigação de crimes foi o Paraná, que vem atuando com essa tecnologia desde 2009. O primeiro caso a ser solucionado foi de um homem preso acusado de mais de 20 estupros onde ocorreu a comparação do DNA do suspeito coletada através da saliva e o material genético na escova de dente que o mesmo descartou em uma das cenas do crime (BRASIL, 2012).

Em muitos casos, porém, o banco de dados não serve apenas para condenação de criminosos como também para reverter prisões de indivíduos que foram injustiçados pela a legislação. No Brasil, temos como exemplo um caso ocorrido em 2008 onde foi comparada a amostra coletada de um colchão com o material genético cedido voluntariamente pelo o indivíduo que já estava preso, apontando que o mesmo havia sido preso injustamente (BRASIL, 2012).

Diante do exposto, vamos demonstrar: Qual a importância da utilização do BANCO de DADOS de DNA na elucidação de crimes? O objetivo desta revisão bibliográfica foi verificar qual utilização dos bancos de dados de DNA na resolução de crimes e identificação de indivíduos e o papel do farmacêutico como perito criminal.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para o levantamento de informações foi realizada uma pesquisa descritiva, qualitativa utilizando os descritores: DNA, investigação criminal, farmacêutico e banco de dados. As bases de dados utilizadas foram: Scielo, Pubmed, além de livros e monografias, no período de 04 de abril de 2018 até 01 de maio de 2020. Os dados coletados foram em português e inglês.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontrados 45 artigos, dos quais 26 foram utilizados para escrever o presente trabalho, com base em seus conteúdos, relevância e ano de publicação.

3.1. IDENTIFICAÇÃO CIVIL E CRIMINAL

As provas coletadas das cenas de crimes exigem que o perito criminal seja especialmente crítico tanto para coletar e analisar as provas (GARDNER, 2005), quanto para inferir seu valor interpretativo (WEBER - LEHAMAM, et al, 2014). Em se tratando de provas, existem dois tipos de local a serem investigados: aquele em que muitas pessoas o frequentam, ou seja, a coleta de material e identificação será mais difícil e locais nos quais já se conhece os seus frequentadores, e portanto, o encontro de digitais diferentes, fios de cabelos diferentes e outros materiais que não sejam de indivíduos frequentes, já são suspeitos em potencial (WEBER - LEHAMAM, et al, 2014).

No Brasil as perícias são realizadas por peritos oficiais que estão dentro da polícia, e em algumas situações, por técnicos. As análises são feitas geralmente por dois peritos capacitados, mas caso não estejam disponíveis, dois indivíduos de nível superior e capacidade técnica, chamados de peritos não oficiais são nomeados por autoridade policial e judiciária para este fim. Não podem ser peritos criminais: analfabetos, pessoas com menos de 21 anos e indivíduos com depoimentos em processo, (BRASIL, 2012).

A perícia criminal possui áreas estratégicas para sua atuação. Conforme apontado pelo caderno Didático de Criminalística da ANP e o Manual de Serviços da Criminalística, a área de atuação do perito criminal farmacêutico é muito vasta, destacando-se (BRASIL, 2012):

- Perícias Documentoscópicas – a mais comum visa crimes no sistema financeiro como fraudes, falsificações e assinaturas em documentos, entre eles.

- Perícias Contábeis – são investigados crimes do colarinho branco, sonegação de impostos, crimes de desvio de dinheiro, corrupções e outros ligados ao gasto recursos públicos e privados.
- Perícias de Engenharia – estão mais atreladas a licitações e conclusões de obras, verificando se todo o valor e materiais foi realmente utilizado na quantidade correta, análises de obra de arte e até rachadura e derramamento de barragem.
- Perícia de Informática – é uma das perícias mais importante devido a tecnologia está tão acessível, investigam os rastros em sites ilegais, exploração sexual via internet entre outros que envolvem tecnologia da informação.
- Perícia de Laboratório – visa analisar drogas, medicamentos manipulados incorretamente e substâncias ilícitas.

Perícias em Locais – geralmente são peritos de vários cursos superiores para desvendar crimes violentos.

- Perícia de Meio Ambiente – investigam crimes referente ao meio ambiente como, poluição, queimadas criminais, patrimônio cultura valorizando os recursos naturais.
- Perícia de Autovisual – envolve investigação de imagem estáticos, alteração de vídeos e áudios, verificando adulteração dos meios de comunicação, nest perícia entra os recursos de reconhecimento facial.
- Perícia de Medicina e Odontologia Forense – é uma área nova na perícia, que permite investigar indivíduos mortos e vivos da área corporal.
- Perícia em Veículos – são um dos locais que mais apresentam vestígios, e são utilizados em crimes.
- Perícia em Balística – envolve arma de fogo ou projetos de munições.

3.2 DNA

Na perícia, Micklos, Freyer e Crotty (2005) destacam que o pesquisador britânico Allec Jeffereys foi o primeiro a estudar o DNA em uma investigação de homicídios, foi ele também que utilizou pela a

primeira vez a expressão — impressões digitais de DNA||. É no DNA que estão contidas as características genéticas de cada ser humano, em todas as suas células. Essas características são formadas pela junção dos gametas de seus pais, no momento da fecundação e permanecem por toda a sua vida. (BORGES E OSÓRIO, 2013).

O DNA é o ácido desoxirribonucleico formado por duas fitas dispostas helicoidalmente, retorcidas, formando uma espiral, compostas por nucleotídeos, constituídos por moléculas de açúcar, fosfato e base nitrogenada (timina, adenina, guanina e citosina). (BONACCORSO, 2005). Essa molécula tem grande estabilidade química e física, sendo difícil a degradação da mesma. (BONACCORSO, 2005).

O DNA apresenta 99% da sequência das bases nitrogenadas pareadas igualmente para todos os indivíduos, sendo apenas 0,1% da região que não se codifica o que diferencia a população (ROEWER, 2013). Essa região possui sequências de nucleotídeos que se repetem muitas vezes ao longo da cadeia do genoma; são sequências hipervariáveis do DNA chamadas SNPs (*Single Nucleotide Polymorfism*), ou seja, essa é a região de maior interesse quando se fala em marcadores genéticos (SANTOS, 2014).

O FBI (*Federal Bureau of Investigation*) propõe 13 loci (regiões) de análise para esses marcadores genéticos, dentro da cadeia do DNA que nada mais são do que a localização onde as variações/repetições estão localizadas no genoma, também chamadas de STR (*Short Tandem Repeats*) (Katsanis & Wagner, 2013). O método de análise dos marcadores genéticos é utilizado para identificação de corpos em decomposição, restos mortais em desastres, para atestar paternidade e para análise de indivíduos nas cenas de crimes (WALLACE, 2006).

3.3 ANÁLISE DO DNA

Existem alguns reagentes que ajudam na análise de 23 marcadores, podendo ser analisadas 23 regiões simultâneas do DNA, lembrando que estes marcadores são aqueles que estão em regiões não codificantes, ou seja, que não estão relacionados diretamente com a produção de proteínas (OOSTDIK, et al, em 2012).

A análise de DNA nos laboratórios forenses permite não só a comprovação da autoria do crime, mas também a identificação de pessoas que estão sendo condenadas injustamente. A ferramenta está servindo para inocentar indivíduos acusados nos principais países como Estados Unidos, Grã-Bretanha e até o Brasil. Porém a prova do DNA em uma investigação criminal só é considerada pela justiça, se for coletada, preservada, analisada e interpretada adequadamente, seguindo preceitos legais e procedimentos pré-estabelecidos pela legislação (GARDNER, 2005).

3.4 BANCO DE DADOS DE DNA

De acordo com Weber-Lehmann, et al, 2014, devido à grande sofisticação dos crimes, a criatividade dos criminosos e a facilidade de informações distribuídas na internet, a polícia viu a necessidade de aprimorar a tecnologia a seu favor, por isso, as técnicas de investigação vêm sofrendo avanços importantes. Uma delas é a o uso da informática para obter mais rápidas informações devido à grande quantidade de registros policiais. Banco de dados de DNA: uma ferramenta a serviço da Justiça. (GODINHO, 2015).

Para perfis criminais, o armazenamento é feito no sistema CODIS (Combined DNA Index System). Esse é um *software* desenvolvido pelo Estados Unidos e utilizado em outros estados e nações. Ele permite armazenar e cruzar informações dos perfis genético, desde que se tenha um perfil já armazenado que será comparado a uma amostra, sendo um sistema integrado que permite que um o vestígio seja comparado em diferentes regiões, ou seja, um Banco Genético Nacional permite visualizar um crime que foi realizado em Mato Grosso do Sul, e o autor foi detido no estado do Amazonas, os dados são traçados e comparados com a autoria (DNA INITIANITE, 2012).

O CODIS vem substituindo os livros de provas utilizado pela a polícia, o sistema tem aumentado a eficácia e a velocidade dos laboratórios forense. Para a Secretaria de Segurança, o sistema permite prevenir o incidente de alguns crimes cometidos pelo o mesmo autor, diz (FERRO JÚNIOR, 2008). Tal sistema armazena dois perfis genéticos: um deles com amostra de perfil em que não se tem a identificação do vestígio coletado, e o outro o vestígio referência onde existe a identificação do indivíduo, ou seja, ele já cometeu algum tipo de infração ou indivíduos desaparecidos e as informações são cruzadas pelo o próprio sistema, sendo comparados diariamente (Brasil, 2012; DNA INITIANITE, 2012).

A Interpol (2014) conhecida como Policia Internacional que atua nas fronteiras dos países completa que em 2011, dentre os 163 países do mundo, cerca de mais da metade utilizou a análises de DNA para elucidação de crimes. A interpol possui um banco de dados de DNA com mais de 140 mil perfis de DNA de criminosos, pessoas desaparecidas e corpos sem identificação que são compartilhados a todos os países que através do sistema CODIS. (INTERPOL, 2014).

O sistema CODIS não guarda o perfil do indivíduo, como: nome, data de nascimento, número de CPF, crimes cometidos, características físicas, doenças ou predisposições e características psiquiátras, ele

guarda e compara códigos alfanuméricos do DNA do indivíduo, são estes códigos alfanuméricos que permite a diferenciação de um indivíduo para outro, conforme determina a Lei nº 12.654/12 do Brasil:

Art. 5º - A identificação criminal de pessoas envolvidas com a ação praticada por organizações criminosas será realizada independentemente da identificação civil||.

§ 1º As informações genéticas contidas nos bancos de dados de perfis genéticos não poderão revelar traços somáticos ou comportamentais das pessoas, exceto determinação genética de gênero, consoante as normas constitucionais e internacionais sobre direitos humanos, genoma humano e dados genéticos.

Já no § 3º do artigo 2º da Lei nº 12.654/12 cada estado Brasileiro tem 1a obrigatoriedade de manter o sigilo nas informações e passar os dados apenas através de Laudo de Exame Pericial.

3.5 COMBINED DNA INDEX SYSTEM (CODIS)

O CODIS é uma plataforma informatizada que permite a combinação da ciência forense, informática e tecnologia. Um sistema americano sua metodologia foi aceita nos tribunais americanos em 1988, na época apenas nove estados utilizava o sistema efetivamente, atualmente os 50 estados do Estados Unidos já utilizam, (FBI, 2014). O CODIS se divide em banco de dados Nacional, estadual chamado *State DNA Index System* (SDIS) e sistema em laboratório forense locais chamados *Local DNA Index System* (LDIS) que tenham os padrões de qualidade para análise de DNA forense, todos integrados entre si (Becker, Dutelle, 2013).

O sistema permite organizar o perfil armazenado em três tipos de categoria através de um conjunto de dados de DNA, o primeiro é de cenas de crimes, ou seja, que não são conhecidas, o segundo conjunto são de perfis de criminosos, ou seja, a fonte é conhecida, e o terceiro é o último não menos importante, e o mais recente, são dados de DNA de indivíduos desaparecidos, completa Houck, Siegel (2010).

No Rei Unidos a discussão sobre os direitos individuais vem sendo motivos de protesto e discussões parlamentares, pois o material genético é coletado de pessoas que não foram condenadas, de pessoas que cometeram infrações de trânsito, de indivíduos que jogam bola na rua e indivíduos que não completaram dezoito anos, constata Wallace, 2006.

3.6 BANCO DE DADOS DE DNA BRASILEIRO

De acordo com Fagundes (2010), a implantação de Banco de dados de DNA no Brasil, foi um investimento bastante elevado que partiu do Ministério da Justiça, abarcando os recursos gastos com o treinamento de vários peritos criminais. Por ser uma área de crescimento no Brasil, hoje temos de

18 laboratórios forenses da Polícia Federal que auxiliam a polícia federal brasileira na análise de DNA. (FAGUNDES, 2010).

Em 2010 o Brasil, devido a lei nº 12.654/12, criou a Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos (RIBPG) para gerenciar, organizar e coordenar o banco de perfis genéticos e os laboratórios forenses nacionalmente para benefício da segurança pública para a população. Na época a RIBPG integrava os seguintes estados: Amapá, Amazonas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Pará, Paraíba, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e a Polícia Federal. Os outros estados não aparecem devido não terem laboratórios de DNA, por não apresentarem os requisitos necessários. Nos dias atuais todos os estados brasileiros já apresentam um laboratório forense, inclusive no Distrito Federal, consta o Relatório Anual da Avaliação: ano base 2012, PPA 2016- 2019, que afirma que RIBPG é para:

Propiciar a atuação de excelência dos órgãos de segurança pública da União, e dos Estados do Distrito Federal e dos municípios, assim como de outras instituições, com ênfase no aprimoramento de suas estruturas físicas, organizacionais e modelos de gestão, do desenvolvimento de sistemas de informações bancos de dados, do fortalecimento da atividade de inteligência e reestruturação e modernização do sistema de produção da prova material (Relatório Anual da Avaliação: ano base 2012, PPA 2012-2015).

Para Peduzzi (2008), o Brasil está com a taxa de elucidação de homicídios baseadas nos marcadores genéticos baixa. O país possui mais de 28.000 registros de perfil genético armazenados, porém muitos são apenas de materiais coletados em cenas de crime, pois a legislação permite a coleta do material genético apenas de alguns grupos de indivíduos que tenham cometido determinados crimes como: estupro, crimes hediondos, latrocínio, homicídio, extorsão seguida de morte, sequestro, epidemia com resultado de morte e corrupção, esbarrando nos direitos individuais das pessoas. É importante que o CODIS seja mais uma ferramenta para a elucidação de crimes, porém que não seja a única, pois se trata de um software que pode ocorrer erro no cruzamento de informação e podem ser invadidos. (PEDUZZI, 2008).

3.7 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA

Além da Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos (RIBPG), foi necessária mudança na legislação também, entre ela está a aprovação da Lei nº 12.654 de maio de 2012 que altera a Lei nº 12.037 de 2009 e a Lei nº 7.210 de 1984, onde: a identificação criminal poderá ser pelo o material genético (parágrafo único do art. 5º), os dados do perfil genético devem ser armazenados em banco de dados

genéticos em caráter sigiloso (art. 5º - A), a exclusão do perfil genético só ocorrerá no término do prazo estabelecido em lei (art. 7º - A) e indivíduos que praticarem crimes dolosos, com violência hediondos será obrigatoriamente colido o material genético com técnicas indolor e inseridos no banco de dados de DNA (art. 9º- A). A legislação veta a inclusão do perfil genético doados voluntariamente por parentes de sangue de pessoas desaparecidas, por não ser especificamente do desaparecido. A legislação prevê a criação de um Comitê para traçar regras específicas para garantir a qualidade das informações e o bom funcionamento do sistema, com cinco representantes do Ministério da Justiça, um Representante da Secretaria de Direitos Humanos e cinco representantes do estado e do Distrito Federal (art. 5º, decreto nº 7.950/13).

Conforme Fagundes (2010) o Comitê elaborou e aprovou o Manual de Procedimentos Operacionais da RIBPG, o manual propõe as regras: os laboratórios precisam ter a habilitação exigidas para funcionamento, experiência e qualificação dos profissionais e ter os POP's (Procedimento Operacional Padrão), para o banco de dados estabelece os requisitos de estrutura, utilização, monitoramento e gerenciamento dos perfis genéticos, as amostras que podem ser coletadas como vestígios, os marcadores genéticos aceito para banco de dados e referente a busca de dados e os índices que serão comparados com as evidências, tudo isso para apresentar segurança e conformidades nos dados comprados.

Com relação ao banco de Dados de DNA, seu objetivo é armazenar os perfis genéticos para servir como prova na apuração de crimes, sendo manuseado por um perito criminal das áreas de: biologia, biomedicina, direito, engenharia, farmácia, psicologia, medicina, medicina veterinária, física, ciências contábeis e odontologia, sendo habilitado e com experiência comprovada, afirma (GARDNER, 2005).

3.8 O PAPEL DO FARMACÊUTICO

O papel do farmacêutico na perícia criminal é de suma importância nas demandas para elucidações de crimes como, por exemplo, nas análises de amostras biológicas (sangue) ou não biológicas (droga ou veneno) com conhecimento técnico. (ROCHA, 2016).

O farmacêutico atua seguindo parâmetros dentro das análises de laudos periciais, complementando essas análises e emitindo resultados com informações mais claras e objetivas, graças ao auxílio dos bancos de dados de perfis genéticos. Os bancos são uma prática diária na vida do farmacêutico perito e exigem formação técnica para sua execução. (ROCHA, 2016).

O farmacêutico perito está portanto, por meio das ciências básicas e farmacêuticas aplicadas adquiridas por meio de conhecimento ao longo de sua formação enquanto graduando e pós-graduando, sempre auxiliando nas elucidações de crimes hediondos, paternidade e outras vertentes das ciências forenses. (ROCHA, 2016). O Farmacêutico é apto para atuar em diversos setores (73 no total) e dentre estes está a perícia criminal (CFF, 2009).

A perícia criminal da polícia científica é uma das principais áreas que o toxilista forense pode atuar. Nesta área o farmacêutico especializado, utiliza técnicas de avaliação em pessoas vivas, cadáveres, medicamentos, entre outros, para obter-se informações ou provas em uma investigação policial (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização dos bancos de dados em perfis genéticos tem se mostrado eficiente, tanto nas elucidações de crimes, bem como em casos de indivíduos desaparecidos, mostrando que a tecnologia em prol de benefícios para a sociedade deve ser considerada por se tratar de uma ótima ferramenta para reduzir o índice de criminalidade de determinados delitos sem autor conhecido. É de suma importância o papel do profissional farmacêutico como perito criminal para atender a demanda nas análises periciais utilizando seus conhecimentos técnicos.

REFERÊNCIAS

- ALBARCELOS, Laura Adriana. Identificação Humana e Base de Dados Genéticos. Azcaptotzaldo: Ubijus Editorial, 2009.
- BECKER, Ronald; DUTELLE, Aric. Criminal Investigation. Jones & Bartlett Learning. 4. ed. Burlington/MA, USA. 2013.
- BEZERRA, Carlos César. Exame de DNA: Coleta de amostras biológicas em local de crime. Perícia Federal, Brasília-df, n., p.6-13, jul. 2004. Quadrimestral.
- BONACCORSO, Norma Sueli. Aspectos técnicos, éticos e jurídicos relacionados com a criação de bancos de dados criminais de DNA no Brasil. 2010 .231 f. Tese (Doutorado em Direito Penal) – Faculdade de Direito da Universidade de São Paulo, SP.
- BONACCORSO, Norma Sueli. A aplicação do exame de DNA na elucidação de crimes. 2005. 156 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Direito Penal, Medicina Forense e Criminologia, Departamento de Direito Penal, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- BORGES, Osório, Maria Regina. Genética humana. Porto Alegre. 3ª Edição. Editora ABDR, 2013.
- BRASIL. Lei nº 12.654, de 28 de maio de 2012, Altera as leis nº 12.037, de 1 de outubro de 2009 e nº 7.210, de 11 de julho de 1984, para preverá coleta de perfil genético com forma de identificação criminal e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília nº 103, pág. 1, 29 de maio de 2012. Seção 1.
- CAVALCANTE, Tarcisio Ferreira; QUEIROZ, Paulo Roberto. Banco de dados baseado em marcadores genéticos. Disponível em: www.cpgls.pucgoias.edu.br. Acesso em: 16 maio 2020.
- DNA INITIATIVE. DNA Database Hits. Disponível em: <http://www.dna.gov/dnadatabases/hits>. Acesso em: 17 mar. 2019.
- FAGUNDES, P.R. Introdução ao treinamento no CODIS. Departamento da Polícia Federal. Instituto Nacional de Criminalística. Brasília/DF, Maio de 2010.
- FBI.CODISNDISStatistics.(2014a).Disponívelem:<http://www.fbi.gov/abouts/lab/biometricanalysis/codis/ndis-statistics>. Acesso em: 10/05/2019.
- GARDNER, Ross M. Pratical Crime Scene Processing and Investigation. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2005.
- HOUCK, Max M.; SIEGEL, Jay A. Fundamental of Forensic Science. 2. ed. Burlington: Elsevier, 2010.
- INTERPOL.Forensics.(2014).Disponívelem:<http://www.interpol.int/INTERPOLExpertise/Forensics/DNA>. Acesso em: 10/05/2019.
- JÚNIOR, Celso Moreira Ferro; FILHO, Edemundo Dias de Oliveira; PRETO, Hugo César Fraga. Segurança Pública Inteligente (sistematização da doutrina e das técnicas da atividade). Goiânia: Kelps, 2008.
- LIMA, Hélio Buchmuller. DNA x Criminalidade. Perícia Federal. Brasília – DF, pág.7-11, 2008.
- MICKLOS, David A.; FREYER, Greg A.; CROTTY, David A. A ciência do DNA. Porto Alegre: Artmed, 2005.

OOSTDIK, Kathryn; ENSENBERGER, Martin; SPRECHER Cynthia; BOURDEAUHELLER, Jeanne; KRENKE, Benjamin and STORTS, Douglas. Bridging databases for today and tomorrow: The PowerPlex Fusion System (2012). Promega Corporation. Disponível em: <http://www.promega.com.br/resources/profilesindna/2012/bridging-databases-for-today-and-tomorrow-the-powerplex-fusionsystem/Update>. Acesso em: 03/05/2019.

PEDUZZI, Pedro. Rede Nacional de Genética Forense: Brasil está pronto para ter um banco de dados de perfis genéticos. Perícia Federal, Brasília-DF, n., p.5-6, mar. 2008.

PENA, Sérgio. Segurança Pública: determinação de identidade genética pelo o DNA. Núcleo de Genética Médica de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais. 2005.

ROCHA, Bruno Lula Silva. Atuação do Farmacêutico da Perícia Criminal. Projeto de pesquisa da UNIFACS – Universidade de Salvador/BA, 2016. Disponível em: www.periciaonline.com.br. Acesso em: 16 maio 2020.

ROEWER L. Y DNA fingerprinting in forensics: past, present, future. Investigative Genetics, 5:77-84, 2013.

SANTOS SM. Identificação humana como ferramenta de investigações criminais: Estudo de frequências alélicas de marcadores forenses no Estado de Pernambuco. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco. 2014.

SILVA, Emilio de Oliveira e. Identificação genética para fins criminais: análise dos aspectos processuais de dados de perfil genético implementado pela Lei nº 12,654/2012. Belo Horizonte MG: Del Rey, 2014.

WALLACE, Helen. The UK National DNA Database: Balancing crime detection, human rights and privacy. EMBOReports: Science Society, Alemanha, p.2630. jul. 2006. Disponível em: <http://www.nature.com/embor/journal/v7/n1s/pdf/7400727.pdf>. Acesso em: 29 maio 2019.

WEBER-LEHMANN, Jacqueline; SCHILLING, Elmar; GRADL, Georg; RICHTER, Daniel C.; WIEHLER, Jens; ROLF, Burkhard. Finding the needle in the haystack: Differentiating —identical|| twins in paternity testing and forensics by ultra-deep next generation sequencing. Forensic Science International: Genetics, volume 9, pages 42-46.