

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA**

TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DE XILANASES FÚNGICAS NO
TRATAMENTO DE EFLUENTE TÊXTIL**

LUANA MARIA CAVALCANTI TEIXEIRA

**ORIENTADORA: PROF.^a DR.^a LUANA CASSANDRA BREITENBACH BARROSO
COELHO**

**RECIFE
2022**

LUANA MARIA CAVALCANTI TEIXEIRA

**AVALIAÇÃO DE XILANASES FÚNGICAS NO TRATAMENTO
DE EFLUENTE TÊXTIL**

Tese de Doutorado apresentada como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Leonor Alves de Oliveira da Silva

**Recife
2022**

Catálogo de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Teixeira, Luana Maria Cavalcanti.

Avaliação de xilanases fúngicas no tratamento de efluente têxtil /
Luana Maria Cavalcanti Teixeira. - Recife, 2022.

104f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de
Ciências Biológicas, Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, 2022.

Orientação: Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho.

Coorientação: Leonor Alves de Oliveira da Silva.

Inclui referências e anexos.

1. Planejamento experimental; 2. *Aspergillus fumigatus*; 3. Xilanases;
4. Índigo carmim; 5. Vermelho congo; 6. Efluentes têxteis. I. Coelho,
Luana Cassandra Breitenbach Barroso. II. Silva, Leonor Alves de
Oliveira da. III. Título.

LUANA MARIA CAVALCANTI TEIXEIRA

AVALIAÇÃO DE XILANASES FÚNGICAS NO TRATAMENTO DE
EFLUENTE TÊXTIL

Tese de Doutorado apresentada como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho
Departamento de Bioquímica– UFPE

Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho
Departamento de Bioquímica – UFPE

Prof^ª. Dr^ª. Leonor Alves de Oliveira da Silva
Departamento de Biologia Molecular – UFPB

Prof. Dr. Raphael Carlos Ferrer de Santana, Secretaria de Educação do Estado
de Pernambuco – SEE-PE

Dr. Hallysson Douglas Andrade de Araújo, Pós doutorando do Departamento de
Bioquímica da UFPE

Data: ____/____/____

Dedico este trabalho primeiramente a Deus que sempre esteve comigo em todos os momentos da minha vida. Em especial ao meu esposo e a prof. Leonor que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e me dando suporte nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** nosso pai que tem me acompanhado sempre e me guiado em todas as conquistas e realizações.

À **minha família** que contribuiu com toda minha formação e estrutura.

A **Thiago Lins**, pelo seu amor, carinho, atenção e dedicação. Meu amor obrigado por ter me acompanhado e estado sempre presente com paciência e compreensão nesses últimos meses que precederam essa etapa final de defesa de tese.

À **Prof.^a Dr.^a Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho** pela orientação neste trabalho e pela oportunidade de poder realizar meu doutorado e participar de um grupo de pesquisa tão unido.

À **Prof.^a Dr.^a Leonor Alves de Oliveira da Silva** pela dedicada coorientadora que tem sido, sempre zelosa buscando soluções e planejando metas a serem atingidas para que o trabalho de todos dê certo.

À **Prof.^a Dr.^a Norma Gusmão** por também fazer parte da parceria junto da Prof.^a Luana e Leonor. Obrigado por contribuir na minha caminhada ao mesmo tempo com muita doçura e colo maternal.

À **Prof.^a Dr.^a Maria Tereza dos Santos Correia** e à **Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho**, coordenador e vice coordenador, respectivamente do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia pela atenção prestada a seus alunos de pós-graduação.

À **Sheila Araújo Pereira de Oliveira**, secretária do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia por ser prestativa, atenciosa e eficaz sempre que solicitada.

Aos **meus colegas de trabalho do LAMAI-UFPE e Biomicro- UFPB** pela contribuição, companheirismo e atenção em nosso dia a dia repleto de afazeres

À **Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE)** pela concessão da bolsa de estudos e auxílio financeiro.

RESUMO

As atividades realizadas por microrganismos além das enzimas produzidas por eles são uma importante ferramenta quando há necessidade de utilizar produtos naturais eficientes como sistemas mediadores biocatalisantes efetivos para o tratamento de efluentes de têxteis. A utilização dessa estratégia é uma alternativa viável e natural para melhoria da biodegradação desses poluentes. Além disso, podemos encontrar em outros estudos enzimas capazes de serem empregadas no próprio processo industrial a fim de se obter materiais mais degradáveis e que causem menos impactos nos processos de produção industrial. Nosso trabalho consistiu em avaliar o potencial fúngico na descoloração de corantes têxteis e a produção aprimorada e caracterização parcial de xilanase por um *Aspergillus sp.* sob fermentação em estado líquido. Foram utilizadas 4 cepas fúngicas distintas capazes de descolorir corantes utilizados na indústria têxtil como vermelho congo e índigo carmim diluídos em Meio Normal de Descoloração (MND). A triagem do melhor fungo foi realizada para avaliar a capacidade de descoloração em meio líquido. Os melhores resultados foram escolhidos para prosseguimento dos ensaios de ecotoxicidade e caracterização dos parâmetros do corante biotratado. As 4 cepas testadas demonstraram percentual de até 96,10% de descoloração dos corantes testados. Em seguida foi realizado os testes de fitotoxicidade que em comparação com o grupo controle negativo teve resultados significativos e promissores com germinação e crescimento das raízes. A caracterização do corante foi realizada e demonstrou DBO, DQO, turbidez e pH de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo CONAMA. Desse modo, ficou claro que a remoção dos corantes através da descoloração realizada pelos microrganismos fúngicos concomitantemente uma melhora na fitotoxicidade do Vermelho congo. Nos próximos passos foi realizada a produção enzimática xilanolítica por *Aspergillus fumigatus* que também já havia demonstrado eficiência na produção dessa enzima. A produção de xilanase por *Aspergillus sp.* foi otimizada usando um planejamento experimental de fermentação em estado líquido no qual diferentes parâmetros de fermentação como temperatura, pH médio, quantidade de substrato foram investigados em nível individual. Todos os parâmetros de fermentação selecionados influenciaram a produção de xilanase. A quantidade de substrato foi o parâmetro de maior influência na produção de xilanase em nível individual. A identificação do microrganismo foi realizada por MALDI-TOF confirmando ser um *Aspergillus fumigatus* pelos espectros da base de dados Biotyper™. As análises realizadas após 72 horas de fermentação, afirmou que o ensaio 8 obteve os melhores índices de atividade (pH 8, 35 °C, 1 % de substrato) sendo este a melhor condição de produção xilanolítica. O extrato enzimático demonstrou características de estabilidade de pH num platô entre 4 e 5 além de atividade enzimática no pH 7. Manteve-se estabilidade em diferentes pH durante 24hs. A melhor temperatura de produção da enzima foi obtida em 60°C com estabilidade em diferentes temperaturas e tempos de incubação. A enzima teve sua atividade testada frente a diferentes substratos confirmando a atividade principal por xilano de Birchwood. Ao analisar os resultados, pôde-se perceber que o aumento da concentração de substrato (0,25 a 1,0%) exerceu influência significativa na utilização do substrato pela enzima. Foi possível traçar o perfil de proteínas contidas na amostra da cultura de microrganismos realizando-se SDS-PAGE e posteriormente Zimograma utilizando xilano de Birchwood como substrato. *Aspergillus sp.* demonstrou ser um promissor candidato na produção de xilanases. Todos os resultados obtidos estão de acordo com os objetivos

propostos. Em conclusão, sugere-se que os microrganismos são ferramentas eficientes para aplicação em biorremediação e produção de biomoléculas ativas para aplicações industriais.

Palavras Chaves– Planejamento experimental, *Aspergillus fumigatus*, xilanases, índigo carmim, vermelho congo, efluentes têxteis, detergentes.

ABSTRACT

The activities carried out by microorganisms in addition to the enzymes produced by them are an important tool when there is a need to use efficient natural products as effective biocatalyst mediating systems for the treatment of textile effluents. The use of this strategy is a viable and natural alternative to improve the biodegradation of these pollutants. In addition, we can find in other studies enzymes capable of being used in the industrial process itself in order to obtain more degradable materials that cause less impact on industrial production processes. Our work consisted in evaluating the fungal potential in the discoloration of textile dyes and the improved production and partial characterization of xylanase by an *Aspergillus* sp. under liquid state fermentation. Four different fungal strains capable of decolorizing dyes used in the textile industry such as Congo red and indigo carmine diluted in Normal Decolorization Medium (MND) were used. Screening for the best fungus was performed to assess the ability to decolorize in liquid medium. The best results were chosen for the continuation of the ecotoxicity tests and characterization of the parameters of the biotreated dye. The 4 strains tested showed a percentage of up to 96.10% of discoloration of the dyes tested. Then, the phytotoxicity tests were carried out, which in comparison with the negative control group had significant and promising results with germination and root growth. The characterization of the dye was performed and demonstrated BOD, COD, turbidity and pH according to the parameters established by CONAMA. Thus, it became clear that the removal of dyes through the discoloration performed by fungal microorganisms concomitantly improved the phytotoxicity of Congo Red. In the next steps, the xylanolytic enzyme production was carried out by *Aspergillus fumigatus*, which had already demonstrated efficiency in the production of this enzyme. The production of xylanase by *Aspergillus* sp. was optimized using a liquid state fermentation experimental design in which different fermentation parameters such as temperature, average pH, amount of substrate were investigated at an individual level. All selected fermentation parameters influenced xylanase production. The amount of substrate was the parameter with the greatest influence on xylanase production at an individual level. The identification of the microorganism was performed by MALDI-TOF, confirming it to be an *Aspergillus fumigatus* by the spectra of the Biotyper™ database. The analyzes carried out after 72 hours of fermentation, stated that assay 8 obtained the best activity indexes (pH 8, 35 °C, 1 % of substrate), which is the best condition for xylanolytic production. The enzymatic extract showed characteristics of pH stability at a plateau between 4 and 5, in addition to enzymatic activity at pH 7. Stability was maintained at different pH for 24 hours. The best enzyme production temperature was obtained at 60°C with stability at different temperatures and incubation times. The enzyme had its activity tested against different substrates, confirming the main activity by Birchwood xylan. When analyzing the results, it was possible to notice that the increase in the substrate concentration (0.25 to 1.0%) had a significant influence on the use of the substrate by the enzyme. It was possible to trace the profile of proteins contained in the microorganism culture sample by performing SDS-PAGE and subsequently Zymogram using Birchwood's xylan as substrate. *Aspergillus* sp. demonstrated to be a promising candidate in the production of xylanases. All the results obtained are in accordance with the proposed objectives. In conclusion, it is suggested that microorganisms are efficient tools for application in bioremediation and production of active biomolecules for industrial applications.

Keywords – Experimental design, *Aspergillus fumigatus*, xylanases, indigo carmine, Congo red, textile effluents, detergents.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	JUSTIFICATIVA	12
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	13
2.1	A POLUIÇÃO NO NOSSO MEIO AMBIENTE - EFLUENTE TÊXTEIS 13	
2.2	CORANTES TÊXTEIS.....	16
2.3	POTENCIAL DOS MICRORGANISMOS NA BIODEGRADAÇÃO	20
2.4	ENZIMAS.....	22
2.4.1	HIDROLASES	23
2.4.2	CELULOSE	24
2.4.3	XILANO	25
2.4.4	XILANASES	26
2.4.5	APLICAÇÃO COMERCIAL DAS XILANASES.....	27
2.5	FATORES QUE INFLUENCIAM NA VELOCIDADE DAS REAÇÕES 28	
2.5.1	PH E TEMPERATURA.....	28
3	OBJETIVOS	29
3.1	GERAL	29
3.2	ESPECÍFICOS.....	29
4	REFERÊNCIAS.....	30
5	ARTIGO 1: FUNGAL POTENTIAL FOR THE DECOLORIZATION OF TEXTILE DYES	37
6	ARTIGO 2: POTENCIAL DE XILANASES POR FUNGO XILANOLÍTICO- PLANEJAMENTO ESPERIMENTAL.....	49
7	ARTIGO 3: XILANASE FROM <i>ASPERGILLUS FUMIGATUS</i>	56
8	CONCLUSÕES.....	57
9	ANEXOS.....	58
9.1	ATIVIDADES REALIZADAS EM PARALELO	58
9.1.1	ARTIGOS.....	58
9.1.2	CAPÍTULOS DE LIVROS	69

1 INTRODUÇÃO

A indústria têxtil utiliza em seu processo de tingimento diversos tipos de corantes e utiliza grandes volumes de água para padronização dos tecidos. Além do mais, os tecidos que são customizados, como o *jeans*, nos processos de lavagem geram efluentes com diversos corantes e com destaque para o tipo índigo. Estes corantes mesmo em pequenas quantidades apresentam potencial poluidor podendo mudar a coloração de um corpo hídrico impedindo que os raios solares sejam transmitidos para os seres vivos existentes nestes ambientes aquáticos levando-os a morte (KISHOR *et al.*, 2021).

A toxicidade de efluentes é atribuída, em alguns casos, à presença de compostos de difícil degradação, tais como alcalinos, ácidos e sólidos solúveis. Lançados em corpos hídricos sem tratamento adequado, esses materiais causam efeito acumulativo e, quando atingem altas concentrações, são letais para organismos que vivem nesse tipo de ecossistema. Diante dessa problemática, é crescente a ocorrência de estudos que busca estabelecer medidas para remoção ou mineralização de tais contaminantes. As tecnologias desenvolvidas com esses fins visam minimizar o volume e a toxicidade da água desprezada por esse setor industrial (WANG, X.; JIANG; GAO, 2022)

É grande a complexidade e a diversidade de compostos presentes nesses efluentes. Por isso, a legislação brasileira, frequentemente ignorada por produtores têxteis, é rígida quanto ao trato adequado desses produtos. O desenvolvimento de tratamentos que resultem na eliminação da toxicidade e considerem fatores como custo, tempo e eficiência do processo de tratamento desses poluentes é uma demanda urgente para a preservação dos nossos corpos hídricos. Na atualidade, as tecnologias de tratamento com efeito conhecido envolvem o uso de processos físico-químicos e biológicos, sendo o primeiro o mais utilizado. Mas, a biodegradação (promovida por micro-organismos) tem se mostrado eficiente na diminuição da poluição causada pelos corantes industriais (ADANE; ADUGNA; ALEMAYEHU, 2021)(SKANDA *et al.*, 2021).

O uso de enzimas é um exemplo de estratégia para biodegradação que se mostra eficaz no tratamento de efluentes. Esse tipo de atividade biológica é utilizado em diversos campos da indústria, porque é capaz de gerar alta produção com baixo custo, além de ser uma estratégia *eco-friendly*. O processo de produção enzimática envolve uma série de fatores físicos-químicos e nutricionais, que aumentam o rendimento e a qualidade desse material biológico, tornando

sua aplicação viável em grande escala com alta eficiência (KUMAR *et al.*, 2021) (SKANDA *et al.*, 2021).

Além do tratamento de efluentes de têxteis, as enzimas de microrganismos são capazes de desempenhar ação biodegradante em tintas das indústrias de impressão, minimizando o impacto ambiental causado pelo descarte inapropriado também desse tipo de poluente. As lacases, peroxidases, tirosinases e xilanases são exemplos conhecidos de enzimas capazes de desempenhar esse papel. Elas são secretadas por microrganismos fúngicos largamente estudados (*Aspergillus sp*, *Fusarium solani*, *Cladospora cladosporioides*, *Trametes versicolor*, e *T. Villosa*) e aplicados em setores industriais que enxergam esses produtos como instrumento eficiente para o tratamento biológico de resíduos contaminantes (WANG, Jia *et al.*, 2021)(SHARMA *et al.*, 2020) (MUGDHA; USHA, 2012).

Nesse contexto, o presente estudo se concentrou em avaliar o potencial de microrganismos na descoloração de corantes têxteis e produção de enzimas xilanolítica visando uma aplicação.

1.1 JUSTIFICATIVA

Já se sabe que a indústria têxtil necessita de elevada demanda de água em seus processos, o que gera grande quantidade de águas residuárias que podem conter altas cargas de sais dissolvidos, surfactantes, sólidos, suspensos e matéria orgânica, principalmente de corantes na forma de moléculas complexas (KISHOR *et al.*, 2021). Além disso, pode-se constatar que nem sempre é cumprida de maneira correta a legislação vigente para descarte de rejeitos industriais da indústria têxtil, causando um impacto ambiental considerável que afeta o ecossistema local inclusive o próprio homem. Dado o problema exposto, há a importante necessidade atual de se criar soluções que minimizem esses impactos e que não interfiram de maneira prejudicial no ecossistema. Para tal, tem-se realizado estudos imersos na degradação de compostos químicos por microrganismos conhecidos pela sua grande capacidade de adaptação e crescimento em condições ambientais pouco ou totalmente desfavoráveis e que são capazes de produzir enzimas intracelulares e extracelulares que desempenham sua função na degradação de moléculas presentes no ambiente (PIZATO *et al.*, 2017).

Sendo assim, o objetivo principal deste trabalho está apoiado na hipótese de que a ação biológica de enzimas fúngicas, sejam eficazes o suficiente para promover a despoluição de efluentes, trazendo uma importância industrial e ambiental bastante relevante para os seus microrganismos produtores como por exemplo o gênero *Aspergillus* com potencial produção

de enzimas lacase, celulase, amilase e lipase na descoloração de corantes sintéticos (BERNAL et al., 2021). Estudos demonstram que os *Aspergillus*, além de serem capazes de produzir enzimas tem efetivamente, com alto poder de descoloração de diferentes corantes. Contribuindo para a biodegradação de corantes eliminados da indústria têxtil nos efluentes (DHARAJIYA; SHAH; BAJPAI, 2016).

Além de verificar a capacidade dos mesmos microrganismos selecionados para o trabalho produzirem enzimas com atividade enzimática desejável para aplicações industriais futuras. Sabendo que os microrganismos são amplamente estudados por serem produtores de um arsenal de enzimas com uma vasta aplicabilidade e versatilidade. Para isso é necessários que estes produzam enzimas com baixo custo para sua manutenção e produção, além de, alta produtividade para aplicação em escala industrial (JAVED; AMAN; QADER, 2017; OTERO, 2015).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A poluição no nosso meio ambiente - efluente têxteis

O homem almeja a séculos desenvolvimento e riquezas e para isso ele marca o mundo com guerras e devastações ambientais, estas atitudes estão se tornando cada vez mais crescentes ao passar do tempo. Ao longo dessa busca por desenvolvimento e poder, principalmente o desenvolvimento tecnológico, não foi realizado estratégias na mesma velocidade para a preservação ambiental. Mas mesmo com essa crescente sede de desenvolvimento, também está crescendo o desejo de consumir e desenvolver produtos sustentáveis. Na última década esse desejo tem recebido, atenção política crescente, com muitos países e organismos internacionais como a OCDE e a EU (GAWEL; PANNICKE; HAGEMANN, 2019).

É nesse contexto que vem se discutindo a possibilidade de uma transição de modelo econômico – de um que não se preocupa com a conservação do meio ambiente para outro baseado no desenvolvimento sustentável. Essa nova consciência é um tópico contínuo de discussão, em grande parte devido à sua aceitação como uma das ações essenciais para o enfrentamento das mudanças climáticas (DA SILVA *et al.*, 2020). Diversos estudos apontam para a importância de criar estratégias focadas em sustentabilidade e o desenvolvimento de métodos capazes de minimizar, tratar e até mesmo mitigar danos ambientais causados pela indústria. A busca pela aplicação de biomoléculas ativas já se destaca como uma das soluções

biotecnológicas de maior interesse nessa conjuntura das atividades voltadas para a bioeconomia (KISHOR *et al.*, 2021).

A contaminação de corpos de água do nosso ecossistema pelos rejeitos das linhas de produção de diversos setores da indústria não são uma realidade recente. Lagos, rios e até mesmo algumas porções de faixa litorânea são usados como local de descarte do lixo tóxico de inúmeras fábricas. Os efeitos desse tipo de contaminação extravasam o ambiente aquático e atingem também o ar atmosférico. Por consequência, a natureza sintética desses rejeitos causa prejuízo não só à vida adaptada nas águas, mas gera um efeito em cadeia que atravessa fauna e flora terrestres e atinge até mesmo a própria comunidade humana (ATHIRA; JAYA, 2018). Sendo assim, é necessário ponderar que, apesar do desenvolvimento industrial figurar entre as principais ferramentas de desenvolvimento econômico mundial, é – em antítese – um protagonista das ações causadoras de destruição ambiental que conhecemos (KHAN; MALIK, 2018).

A indústria têxtil, por exemplo, usa uma ampla gama de produtos químicos, incluindo corantes, que são constituintes importantes de várias etapas da fabricação de diversos tecidos (KHAN; MALIK, 2018). A caracterização dos efluentes têxteis e seu impacto no ambiente aquático é uma questão preocupante e tem incentivado o desenvolvimento de agentes biológicos para tratamento e reutilização de águas residuais – uma solução sustentável para diminuir os impactos ambientais causados por essa atividade econômica (ATHIRA; JAYA, 2018).

Esse setor da nossa economia consome ano após ano uma enorme quantidade de água potável: são usados cerca de 200 litros de água para a fabricação de 1 kg de tecido tingido. Essa grande quantidade de água residual, contaminada com corantes e produtos químicos tais como metais pesados e sulfetos, costuma ser depositada em corpos d'água, sem qualquer tratamento prévio – conforme exemplificado na figura 1 (KHAN; MALIK, 2018) (Figura 1). Uma desobediência grave à legislação ambiental vigente.



Figura 1: Aspecto do descarte de água contendo produtos químicos em geral sem tratamento prévio adequado.
 Fonte: Entrevista mostrando a contaminação dos descarte da água proveniente das lavanderias têxteis 25/01/2017 21h08(GLOBO, [s. d.]).

A literatura mostra que os efluentes decorrentes das indústrias têxteis são considerados um dos maiores geradores de efluentes líquidos poluentes, descartando toneladas de corantes têxteis no meio ambiente. Afetando o ecossistema aquático, a fertilidade do solo, o crescimento e a produtividade das plantas e a suscetibilidade das plantas a patógenos, ou seja, todo o desenvolvimento da fauna e flora entorno de onde ele está sendo descartado (SARATALE et al., 2020). Essa poluição, podem alcançar as águas superficiais e subterrâneas de forma pontual ou difusa. Geralmente, a poluição é causada por compostos heterogêneos, como orgânicos (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, alquil benzenos, compostos orgânicos voláteis, poluentes orgânicos persistentes), inorgânicos, nutrientes, metais pesados, micro poluentes e vários outros mais. Todos esses poluentes descartados tem efeitos que podem ser irreversível no meio ambiente, apresentando um comportamento recalcitrante e mutagênico (BUI et al., 2019).

Na atual conjuntura, o tratamento de efluentes de diferentes materiais de forma sustentável são a política de maior prioridade de vários países do mundo. São um dos requisitos essenciais para o ambiente atual proteger a água da poluição ou desenvolver qualquer método com boa relação custo-benefício. Porém, mesmo com toda preocupação a probabilidade de interromper o lançamento de águas residuais no meio ambiente é baixa. Métodos e técnicas são desenvolvidos para diminuir os impactos ambientais ou até mesmo sanar estes impactos (Figura

2). Porém, cada método demonstram seus percalços e melhores características de como aplicá-los, mais nenhum resolve por completamente os problemas gerados por esses efluentes (YADU et al., 2020).

Figura 2: Esquema geral dos principais métodos no tratamento de efluentes. Esquema geral dos principais métodos no tratamento de efluentes. Fonte: modificado de (SANCHES FREIRE et al., [s. d.]).



2.2 Corantes têxteis

Os corantes sintéticos podem ser classificados segundo a sua estrutura e com propriedades e características diferentes. E considerando assim as suas diversidades estruturais se fazendo necessário também a sintonização dos desenvolvimentos de tratamentos adequados específicos.

O processo de tingimento utilizando os corantes é realizado em escala industrial em todo o mundo, mas após o término eles precisam ser tratados para posterior descarte na natureza, para que a própria natureza se incumba do término da degradação de forma natural. Porém, após seu tratamento físico-químico esses corantes podem ser transformados em subprodutos com ainda alto potencial poluidor ao meio ambiente (CHOI, 2021).

Normalmente os corantes que devem ser utilizados são de preferência biodegradáveis em condições aeróbicas necessitando de tratamentos específicos mas gerando muitas vezes subprodutos como o lodo e sólidos insolúveis (SAKLI *et al.*, 2021). Trabalhos recentes demonstram alguns tipos de tratamentos estão sendo estudados para a transformação mais

eficiente e com menos danos ambientais do índigo carmim, como a biocatálise, fotocátálise e termocatálise (NNADOZIE; AJIBADE, 2021; SAKLI *et al.*, 2021).

Extraídos de matéria vegetal e animal, os corantes têxteis naturais foram usados desde antes do nascimento de Cristo. Aproximadamente até o século XIX, todos os corantes utilizados para colorir e imprimir tecidos eram de origem natural. A literatura mostra que o uso dos colorantes sintéticos começou em 1856, quando o químico William Henry Perkin sintetizou em laboratório compostos conhecidos mais tarde como Púrpura Anilina, Púrpura Tyrin e Mauveína (SHERTATE; THORAT, 2014)

Em 1956, o lançamento comercial de corantes reativos representaram importante avanço para tingimento do algodão. Daí em diante, a pesquisa e o desenvolvimento de novas fórmulas colorantes se intensificaram e muitos novos corantes foram dispostos no mercado. Até que, no início do século XX, a comercialização dos corantes com origem sintética conseguiu suprimir completamente a dos corantes de origem natural (GORDON E GREGORY, 1983; WELHAM, 2000; SHERTATE, R.S. e PRAKASH, T., 2014).

De forma geral, os corantes sintéticos possuem dois componentes: os cromóforos (receptores de elétrons) e o auxocromos (doadores de elétrons). A junção desses dois grupamentos é chamada de cromogênio. Esses constituintes regulam a solubilidade e a capacidade de tingimento. Enquanto os cromóforos são responsáveis pela tonalidade (alterando as bandas de absorção na região de luz visível), os auxocromos têm a capacidade de ligar o colorante à fibra dos tecidos. A classificação dos corantes têxteis é feita a partir de sua aplicação e da composição química dos cromóforos (TURHAN; TURGUT, 2009; ZUCCA *et al.*, 2016)

Em se tratando desta última, podem ser classificados como: antraquinona, azo, índigoide, nitro, nitroso e trifenilmelilênico – conforme ilustrado na tabela 1, adaptada de QUINTERO *et al.*, 2010; GOMES, 2000. No que se refere à aplicação, o sistema de classificação internacional Colour Index (C.I) os classifica como: à tina ou Vat, ácidos (os do tipo mordaz são considerados uma subclasse de ácidos), azoicos, básicos, diretos, dispersos, ao enxofre, pigmentos, reativos, e solventes – ilustrados na tabela 2.

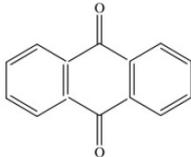
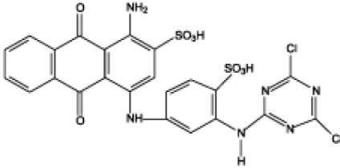
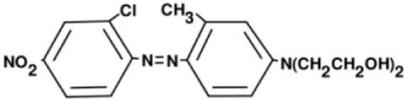
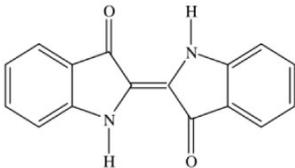
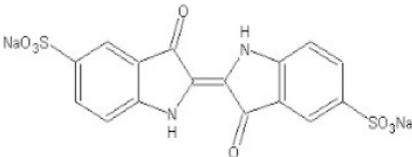
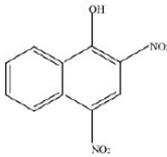
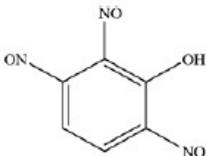
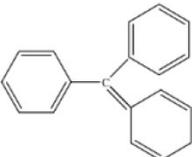
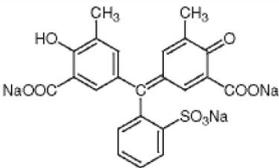
Cromóforos	Estruturas químicas	Exemplo de corante
Antraquinona		 Disperse red 5
Azo	—N=N—	 Índigo carmim
Índigoide		 Reativo azul 4
Nitro	—N(=O)	 Amarelo ácido 24
Nitroso	—N=O	 Verde rápido
Trifenilmelilênico		 Solochrome cyanine R

Tabela 1. Estrutura e classificação dos corantes quanto à composição química. Adaptada de QUINTERO *et al.*, 2010; GOMES, 2000.

Corante	Estrutura	Solubilidade	Aplicação / Afinidade
À tina (ou Vat)	<p>C.I. Vat Yellow</p>	Insolúveis em água	Fibras celulósicas.
Ácidos	<p>C.I. Acid Blue</p>	Solúveis em água	Lã, seda, couro e algumas fibras acrílicas.
Azoicos (ou reativos)	<p>Preto reativo 5</p>	Solúveis em água	Fibras de algodão e celulósicas.
Básicos	<p>C.I. Basic brown 1</p>	Solúveis em água	Lã, seda, fibras acrílicas, e acetato de celulose.
Diretos	<p>Vermelho congo</p>	Solúveis em água	Lã, seda, poliamida e fibras celulósicas.
Dispersos	<p>Orange disperse 30</p>	Insolúveis em água	Acetato de celulose, nylon, triacetato, acrílicos e poliéster.
Ao enxofre	<p>Corante sulfúrico</p>	Insolúveis em água	Fibras celulósicas.

Tabela 2. Estrutura e classificação dos corantes quanto à aplicação. Fontes: BRAGA 2000; CPRH, 2001; SOUZA & PERALTA-ZAMORA, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2010; <http://www.worlddyevariety.com/disperse-dyes/disperse-orange-30.html>; http://textilelearner.blogspot.com/2011/03/defination-classification-application_4761.html; Dye -- Britannica Online Encyclopedia.

Para além da indústria têxtil, os corantes sintéticos são usados também para corar plásticos, cosméticos, e até mesmo alguns alimentos artificiais. Em virtude de sua toxicidade, a liberação desses corantes no meio ambiente representa enorme risco ecológico. Especialmente por terem potencial de bioacumulação, podem afetar diretamente sucessivas etapas da cadeia alimentar (inclusive com caráter carcinogênico) e, portanto, colocar em risco a sustentabilidade

de todas as formas de vida na Terra (CPRH, 2001; SHERTATE, R.S. e PRAKASH, T., 2014; LU *et al.*, 2016).

2.3 Potencial dos microrganismos na biodegradação

A biodegradação ou biorremediação é um mecanismo biológico de reciclagem de resíduos que em outra forma pode ser usada e reutilizada por outros organismos. São umas das técnicas possíveis de fácil aplicação que podem ocasionar menos impactos ambientais de toxicidade no meio ambiente. São econômicas, economizam energia e são ecologicamente corretas para o tratamento de águas residuais. Sendo uma tecnologia de alcance viável para remoção de poluentes orgânicos e inorgânicos por meio de microrganismos ou desintoxicação de produtos químicos perigosos e tóxicos do meio ambiente (YADU *et al.*, 2020).

De acordo com o CONAMA o uso de bioremediadores é uma opção viável nas ações específicas de recuperação do meio ambiente, mais são necessários estudos de como deve ser feita a manipulação. Para que a biorremediação não venha a causar um desequilíbrio ambiental com a sua aplicação. Este bioremediador pode vir a apresentar como ingrediente ativo microrganismos para serem capazes de produzir e de degradar bioquimicamente compostos e substâncias (CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE, 1996).

O princípio principal da biodegradação é ser capaz de degradar e transformar os poluentes. Isso é realizado de forma enzimática e através da metabolização dos microrganismos, por isso tem grande papel de contribuição para resolver muitos problemas ambientais. Bactérias, arqueas e fungos são bioremediadores primários típicos (ABATENH *et al.*, 2017) (Figura 3).

Figura 3: Esquema demonstrando o tratamento biológico de efluente têxtil com microrganismo e envolvimento enzimático.



Os microrganismos estão envolvidos por meio de suas vias enzimáticas agindo como biocatalizadores naturais facilitando o progresso das reações bioquímicas que degradam o poluente alvo. Estes microrganismos atuam contra os poluentes dependendo do acesso a uma variedade de compostos nutricionais gerando energia para seu crescimento, replicação e atividade. A eficiência da biorremediação depende de muitos fatores; incluindo, a natureza química e concentração de poluentes, as características físico-químicas do meio ambiente e sua disponibilidade para microrganismos (ABATENH et al., 2017).

É necessário os estudos sobre os parâmetros da aplicação da biorremediação na descontaminação de efluentes têxteis. A razão da taxa de degradação pode ser afetada por diversas causas. Além disso, os microrganismos biorremediadores crescem de maneira disformes no meio ambiente demonstrando características distintas. O controle é complexo devido a esses fatores de interferência. Há uma variedade de fatores que interferem, como pH, temperatura, concentração inicial de corante e as espécies de microrganismos afetam o processo de descoloração, entre outros (GÜL, 2018). Parâmetros de processos corretos são muito importantes nos processos de biorremediação para atingir os resultados esperados e eficientes (BAGHEL; SAHARIAH; ANANDKUMAR, 2020).

Os microrganismos fúngicos produzem enzimas e vários metabólitos secundários bioativos com valor industrial e podem degradar ou sequestrar pequenas moléculas e macromoléculas inorgânicas e orgânicas (LIU *et al.*, 2021). Eles são encontrados em todos os ambientes e liberam enzimas extracelulares de acordo com sua condição ambiental, sendo capazes de fácil atuação em qualquer quantidade de poluente, mesmo em alta concentração, o que torna sua sobrevivência fácil. (BAGHEL; SAHARIAH; ANANDKUMAR, 2020).

Os fungos podem ser excelentes candidatos para a remoção de corantes. Diferentes cepas de fungos foram relatadas que podem descolorir e também tendo capacidade de bioconverter os corantes encontrados nos efluentes têxteis. A maioria deles utiliza um sistema enzimático extracelular que transforma substâncias complexas em substâncias mais assimiláveis. Os fungos são altamente estudados como biorremediadores por produzirem enzimas específicas que degradam com eficiência (PRZYSTAS; ZABLOCKA-GODLEWSKA; GRABINSKA-SOTA, 2015).

2.4 Enzimas

De acordo com Lehninger (2018) uma das principais características essenciais a vida é a capacidade de catalise. O ser vivo precisa ser capaz de quebrar reações químicas com eficiência e especificidade. As enzimas demonstram um poder catalítico maior que os catalizadores sintéticos, atuando de maneira específica e acelerando reações químicas em condições suaves de temperatura e pH. As enzimas catalisam as reações em etapas degradando grandes moléculas em moléculas menores, transformando e conservando características essenciais para serem usadas como elementos essenciais de outras moléculas precursoras (DAVID L. NELSON; MICHAEL M. COX, 2018).

As enzimas são catalisadores biológicos que aceleram as reações, tendo como o principal papel o controle metabólico (COELHO; SALGADO; BERNARDO DIAS RIBEIRO, 2008). Elas atuam no meio interno ou externo dependendo da sua especificidade sendo conhecidas como endoenzimas ou exoenzimas (DAVID L. NELSON; MICHAEL M. COX, 2018).

Por conta de sua versatilidade, realizam diversos tipos de reações podendo ser classificadas pela segunda as reações que catalisam, em oxido-redutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases, polimerases e oxidoredutases (VOET; VOET, 2018).

Tabela 3: Classificação internacional das enzimas.

Classe n°	Nome da classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons (íons hidrido ou átomos de H)
2	Transferases	Reações de transferência de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água)
4	Liasas	Clivagem de C-C, C-O, C-N ou outras ligações por eliminação, rompimento de ligações duplas ou anéis, ou adição de grupos a ligações duplas.
5	Isomerasas	Transferência de grupos dentro de uma mesma molécula produzindo formas isoméricas
6	Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N por reações de condensação acopladas à hidrólise de ATP ou cofatores similares

Fonte:

Funcionam como máquinas moleculares complexas atuando por diversos mecanismos. Algumas agem sobre apenas um só substrato. Outras sobre dois ou mais. A especificidade pelo substrato e a especificidade em promover reações bioquímicas com seu substrato é uma das características notáveis comparadas com catalisadores químicos. As enzimas são comparadas como catalizadores por atuarem em pequena quantidade e podem ser recuperadas, dependendo das condições de tratamento utilizadas (SANTOS, 2007; VOET; VOET, 2018).

2.4.1 Hidrolases

As hidrolases são nomeadas pelos tipos de reações que executam, como: Amilase – (hidrólise do amido), protease (hidrólise de proteína), celulase (hidrólise da celulose), lipase (hidrólise de lipídeo). As hidrolases utilizam a água como receptor de grupos funcionais de outras moléculas sendo muito importante para o meio industrial, visto que, estão altamente inseridas em indústrias biotecnológicas conferindo uma qualidade melhor a produtos como, por exemplo, aos alimentos: sabor, textura, aroma para que sejam comercializados (FOOD INGREDIENTS BRASIL; FIB, 2011)

A quebra das macromoléculas de celulose e/ou hemicelulose é realizado pelo processo de hidrólise, que consiste na adição de ácido sulfúrico aos resíduos, no caso da hidrólise ácida e/ou pelas ação das enzimas, no caso da hidrólise enzimática. Essa última reproduz o processo existente na natureza, em que a quebra das longas cadeias das moléculas de celulose em açúcares é feita por enzimas (chamadas celulasas, secretadas por fungos ou bactérias, microrganismos que se alimentam da matéria orgânica, alterando-a e formando substâncias químicas (DEMIRBAS, 2007; VALÉRIA DELGADO BASTOS, 2015).

Os microrganismos, plantas e animais por sua vez podem produzir reações capazes de produzir enzimas hidrolíticas com alta importância industrial biotecnológica. Uma dessas enzimas com forte interesse industrial são as celulasas que participam do processo de despolimerização do material lignocelulósico.

2.4.2 Celulose

A celulose é o principal constituinte da biomassa lignocelulósica, sendo um componente estrutural básico da parede celular das plantas. Devido à sua grande abundância de materiais celulolíticos, disponibilidade e baixo preço, é uma das matérias primas mais usada nas transformações biotecnológicas (Celińska, Nicaud, & Białas, 2021).

A lignocelulose é a biomassa mais encontrada em todo o planeta, sendo constituída por 3 principais componentes, a celulose (40 a 60%), a hemicelulose (20 a 40%) e a lignina (10 a 25%). Hemiceluloses são o segundo polissacarídeo terrestre mais abundante na natureza, após a celulose, e representam cerca de 20–40% do peso seco da biomassa lignocelulósica e quando não consumido em sua totalidade seus resíduos são descartados (Malgas, Mafa, Mkabayi, & Pletschke, 2019) (Figura 4). A hemicelulose é um heteropolissacarídeo composto de pentoses (xilose e arabinose), hexoses (manose, glicose e galactose) e ácidos de açúcar (ácido metilglucurônico) (Saha 2003). As hemiceluloses são geralmente agrupadas em classes com base nos principais resíduos de açúcar presentes na estrutura, e incluem xiloglucanos, xilanos, mananos e glucomanos e β -glucanos (Sun, Xiao, & Song, 2017).

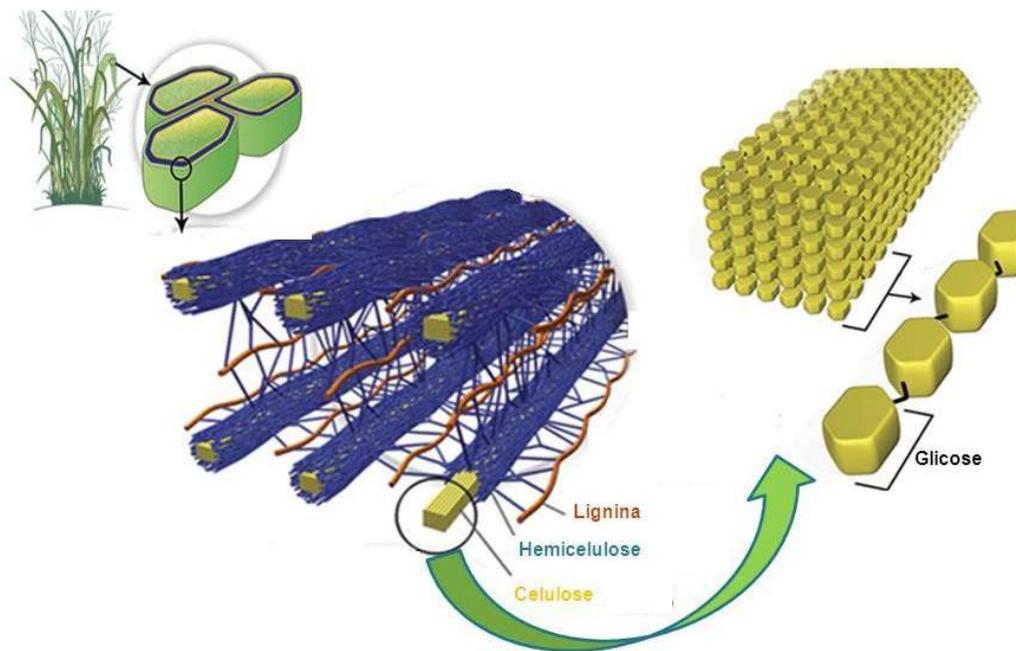


Figura 4: Biomassa lignocelulósica. Fonte: adaptada de (SANTOS et al., 1004)

E devido as paredes celulares das plantas, uma etapa de pré-tratamento é necessária e geralmente realizada para reduzir a recalcitrância da biomassa, levando assim a aumentar a acessibilidade das fibras de celulose à hidrólise enzimática. E muitas vezes vários processos precisam ser utilizados para fracionar os materiais lignocelulósicos incluindo físicos, físico-químicos, químicos e biológicos (SUN; XIAO; SONG, 2017)

2.4.3 Xilano

O xilano é uma hemicelulose constituinte da parede celular das plantas, além de ser também um dos resíduos mais desperdiçados industrialmente. O xilano comercializado é obtido principalmente de palha, sorgo, cana-de-açúcar, talos e espigas de milho e cascas da produção de amido, bem como produtos residuais da polpação de madeiras nobres e moles (Shrivastava, 2020).

A estrutura do xilano (Figura 5) é variável dependendo da sua fonte de obtenção, variando de estruturas lineares constituídas de resíduos de poli-xilose ligados a β -1,4, nomeados como homo-xilanos a hetero-xilanos ramificados, em que o prefixo ‘hetero’ nomeia a presença de resíduos de açúcar ramificados diferentes da D-xilose (MALGAS et al., 2019).

Xilano é uma estrutura homopolimérica de subunidades β - (1,4) -D-xilose, substituída por diversidades de cadeias laterais, predominantemente unidades α -L-arabinosil e α -D-glucuronosil e por meio de ligações de hidrogênio na composição de fita dupla, podem ser categorizados em quatro famílias: Arabinoxylans, Glucuronoxylans, Glucuroarabinoxylans e Galactoglucuronoarabinoxylans (Dos Santos et al., 2018)

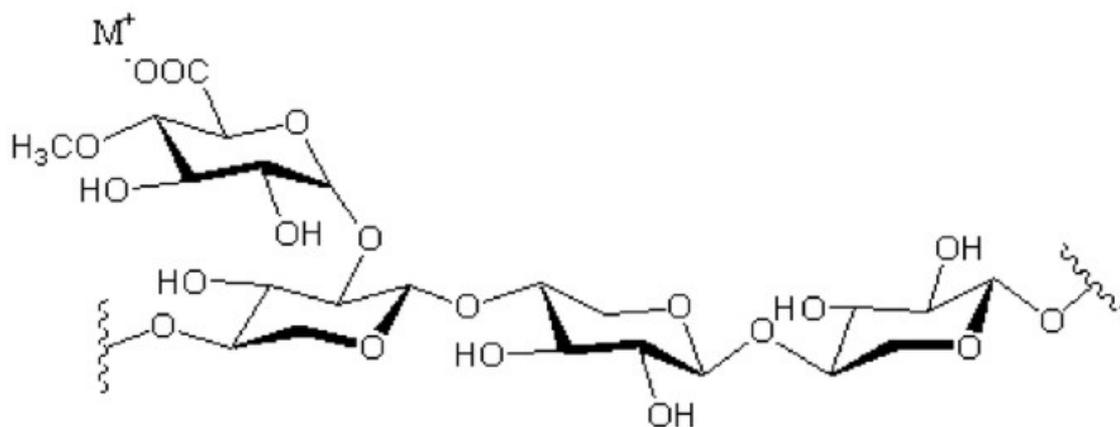


Figura 5: Estrutura química do Xilano. Fonte: (WANG, Jiawei; MINAMI; KAWAMOTO, 2020)

2.4.4 Xilanases

Enzimas xilanolíticas têm sido amplamente utilizadas em alimentos, indústrias farmacêuticas, tratamento de papel e fabricas têxteis (Javed, Aman, & Qader, 2017)(DAR; DAR, 2021). As xilanases são essenciais para a degradação do xilano, atuando na cadeia central, clivando de maneira sinérgica nos locais internos das ligações β -1,4-glicosídicas, os produtos gerados são xilose e xilobiose, como xilooligossacarídeos (Malgas et al., 2019).

Devido à natureza química e complexa da xilana são necessárias diferentes enzimas hidrolíticas com múltiplas especificidades para a sua degradação total de polímeros em monômeros. As xilanases se destacam por serem as mais importantes pelo envolvimento direto na clivagem de ligações glicosídicas (Alokika & Singh, 2019).

Várias enzimas xilanólicas (Figura 6) são necessárias para degradação completa em biomassa lignocelulolítica. atuando de maneira sinérgica de um consorcio de enzimas glicosídeo hidrolases, estas são responsáveis pela degradação de polímeros em monômeros, incluindo endo-1,4- β -xylanases, β -Xylosidases, α -Glucuronidases, α -Arabinofuranosidases e enzimas acessórias, como acetil xilano esterase, esterase de ácido ferúlico e esterase do ácido p-cumárico. Estas enzimas atuam clivando aleatoriamente a estrutura do xilano. Os produtos

de ação são diversos e podem incluir xilobiose, xylotriose, xylotetraose, xilo-oligômeros mais longos e / ou ramificados (Malgas et al., 2019). Avanços crescente são encontrados na literatura em estudos para compreender o sinergismo que ocorre entre as enzimas xilanolíticas durante a degradação de xilanas na biomassa lignocelulósica (Figura 1).

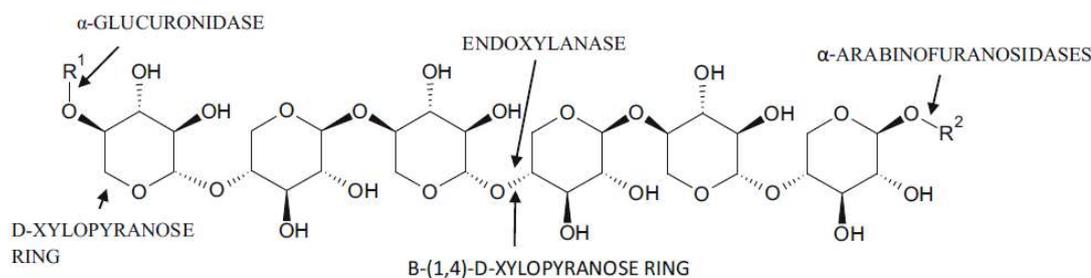


Figura 6: Estrutura do xilano e das enzimas relacionadas a sua degradação. Fonte: (Alokika & Singh, 2019).

2.4.5 Aplicação comercial das xilanases

Ao passar dos anos e o crescente desenvolvimento da economia, o setor industrial necessita buscar a utilização de uma bioeconomia verde e sustentável que exija a utilização completa de matérias-primas renováveis. Muitos microrganismos utilizados nesses setores são incapazes de realizar a biconversão dos principais componentes da biomassa vegetal, por isso muitas vezes eles não são totalmente eficientes. Para isso, se há uma concentração nos estudos sobre o comportamento na produção enzimática desses microrganismos (PROTZKO *et al.*, 2019). O comportamento enzimático das xilanases afeta a estabilidade da enzima ocasionando em um aumento do custo de produção. Estudos demonstraram a importância de se detalhar o perfil do comportamento enzimático xilanolítico, afim de se entender a interação com o meio de produção, como por exemplo a interação com o pH, a temperatura e a quantidade de substrato oferecido (PATEL *et al.*, 2021).

As xilanases são conhecidas na aplicação para melhorar o valor nutricional da silagem, ração verde, café, amido e como agentes de branqueamento na indústria de celulose e papel, além de aplicações como biosubstratos alternativos e eficazes, capazes de reduzir a poluição por problemas causados pela indústria. E descrito na literatura que variedades de microrganismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos, produzem enzimas xilanolíticas com alto potencial biotecnológico (DAR; DAR, 2021).

Alguns trabalhos como o de Romain Bouchat 2022, cita características importantes para a produção de enzimas xilanolíticas eficientes. Como uma atuação em uma ampla faixa de pH,

além de atividade estabilizada em uma ampla faixa de temperaturas ou que se mantenham estáveis em temperaturas específicas, visando a estabilidade enzimática de atuação, sabendo-se que esse fator é muito importante pois os processos industriais são realizados em altas temperaturas para se diminuir possíveis contaminações (BOUCHAT et al., 2022) (TSOTETSI et al., 2020).

2.5 Fatores que influenciam na velocidade das reações

2.5.1 pH e Temperatura

A velocidade das reações enzimáticas não é apenas influenciada pela quantidade de substrato presentes para realizar a atividade, sabe-se que outros fatores também influenciam a realização das reações enzimáticas. Entre eles podemos destacar o pH e a temperatura. Esses fatores podem vir a atuar em sinergia de maneira a tornar a reação mais rápida, prolongando-a ou até mesmo inibindo-a (VOET; VOET, 2018).

O pH e a temperatura influenciam de modo relevante para a realização da atividade enzimática e o seu monitoramento se torna algo importante para o controle satisfatório nos efeitos das reações. O papel do monitoramento e consequentemente o controle do pH e a temperatura é importante para amenizar o efeito de alguma reação brusca que venha acontecer durante o processo. Para ajudar nesse monitoramento do pH é necessário utilizar substratos de boa referência e de alta capacidade e tampões conhecidos para as etapas de umidificação (CUNHA, 2012; DAVID L. NELSON; MICHAEL M. COX, 2018).

Também podemos encontrar a temperatura como um fator crítico no papel da atividade da reação enzimática devido ao acúmulo de calor que é gerado na atividade enzimática (GUSTAVO ADOLFO SAAVEDRA PINTO, 2003). As enzimas são estáveis em temperaturas menores e podem perder sua atividade caso aconteça um aumento brusco na quantidade de temperatura, além de muitas enzimas perderem totalmente sua atividade com o aumento da temperatura. Alguns dos sítios ativos das enzimas podem protonar e desprotonar ao mudar o pH e a temperatura da reação enzimática. Por isso a grande importância de encontrar e determinar o pH e a temperatura ótima das reações (SOUZA, 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Selecionar microrganismo fúngico produtor de xilanase e determinar o potencial de degradação de corantes têxteis pelo microrganismo selecionado.

3.2 Específicos

- Selecionar microrganismos fúngicos na produção de xilanase com atividade concomitante de descoloração de efluentes têxteis;
- Realizar a caracterização físico-química do corante têxtil - (corantes têxteis selecionados índigos carmim e vermelho congo) avaliando a Demanda Biológica de Oxigênio (DBO), Demanda Química de Oxigênio (DQO), turbidez e pH;
- Avaliar o potencial de descoloração dos corantes têxteis utilizados nos ensaios pelo complexo enzimático xilanolítico e com o microrganismo selecionado;
- Avaliar a fitotoxicidade dos corantes têxteis biotratados pelo microrganismo;
- Modificar as condições de cultivo com o melhore produtores da enzima xilanolítica;
- Realizar a caracterização parcial do extrato enzimático xilanolítico
- Aplicação do extrato xilanolítico após a caracterização parcial da enzima.

4 REFERÊNCIAS

ABATENH, E *et al.* The Role of Microorganisms in Bioremediation- A Review. **Open Journal of Environmental Biology**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 038–046, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.17352/ojeb.000007>

ADANE, Teshale; ADUGNA, Amare Tiruneh; ALEMAYEHU, Esayas. Textile Industry Effluent Treatment Techniques. **Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 2021, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2021/5314404>

ALOKIKA; SINGH, Bijender. Production, characteristics, and biotechnological applications of microbial xylanases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 103, n. 21–22, p. 8763–8784, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10108-6>

ATHIRA, N; JAYA, D S. The Use of Fish Biomarkers for Assessing Textile Effluent Contamination of Aquatic Ecosystems: A Review. **Nature Environment and Pollution Technology An International Quarterly Scientific Journal**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 25–34, 2018. Disponível em: [http://www.neptjournal.com/upload-images/NL-63-6-\(4\)-B-3474.pdf](http://www.neptjournal.com/upload-images/NL-63-6-(4)-B-3474.pdf)

BAGHEL, Swati; SAHARIAH, Biju Prava; ANANDKUMAR, J. Bioremediation of Lignin-Rich Pulp and Paper Industry Effluent. *In: COMBINED APPLICATION OF PHYSICO-CHEMICAL & MICROBIOLOGICAL PROCESSES FOR INDUSTRIAL EFFLUENT TREATMENT PLANT*. Singapore: Springer Singapore, 2020. p. 261–278. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-981-15-0497-6_12. Acesso em: 4 mar. 2021.

BERNAL, Suzan P.F. *et al.* Biotechnological potential of microorganisms from textile effluent: Isolation, enzymatic activity and dye discoloration. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], v. 93, n. 4, p. 1–12, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120191581>

BOUCHAT, Romain *et al.* Xylanase production by *Thermobacillus xylanilyticus* is impaired by population diversification but can be mitigated based on the management of cheating behavior. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 1–26, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01762-z>

BUI, Xuan-Thanh *et al.* Introduction to Recent Advances in Water and Wastewater Treatment Technologies. *In: [S. l.]: Springer, Singapore, 2019. p. 3–12*. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-981-13-3259-3_1. Acesso em: 4 mar. 2021.

CELÍŃSKA, Ewelina; NICAUD, Jean Marc; BIAŁAS, Wojciech. **Hydrolytic secretome engineering in *Yarrowia lipolytica* for consolidated bioprocessing on polysaccharide resources: review on starch, cellulose, xylan, and inulin.** [S. l.]: Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11097-1>

CHOI, Kwon Young. Discoloration of indigo dyes by eco-friendly biocatalysts. **Dyes and Pigments**, [s. l.], v. 184, p. 108749, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.DYEPIG.2020.108749>

COELHO, Maria Alice Zarur; SALGADO, Andréa Medeiros; BERNARDO DIAS RIBEIRO. **Tecnologia Enzimática.** Rio de Janeiro: Editora EPUB FAPERJ, 2008.

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE. Resolução 196/96, de 10 out 1996. **Dou**, [s. l.], p. 21082–21085, 1996.

CUNHA, CAROLINA CÂNDIDA DE QUEIROZ BRITO. **CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES E XILANASES PRODUZIDAS POR *Streptomyces* sp. CULTIVADOS EM RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS.** 99 f. 2012. - UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, Goiânia, Brasil, 2012.

DA SILVA, Ayla Sant'Ana *et al.* Constraints and advances in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: a critical review. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 58, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01697-w>. Acesso em: 3 mar. 2021.

DAMIS, Siti Intan Rosdianah *et al.* Protein engineering of GH11 xylanase from *Aspergillus fumigatus* RT-1 for catalytic efficiency improvement on kenaf biomass hydrolysis. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 131, n. July, p. 109383, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109383>

DAR, Farial Mehmood; DAR, Parsa Mahmood. Fungal Xylanases for Different Industrial Applications. [s. l.], p. 515–539, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-85603-8_14. Acesso em: 16 abr. 2022.

DAVID L. NELSON; MICHAEL M. COX. **Princípios de Bioquímica de Lehninger.** 7ª Ediçãoed. Porto Alegre: ARTMED EDITORA LTDA, 2018.

DEMIRBAS, a. Products from Lignocellulosic Materials via Degradation Processes. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 27–

37, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00908310600626705>

DHARAJIYA, Darshan; SHAH, Mitali; BAJPAI, Bhakti. Decolorization of simulated textile effluent by *Phanerochaete chrysosporium* and *Aspergillus fumigatus* A23. **Nature Environment and Pollution Technology**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 825–832, 2016.

FOOD INGREDIENTS BRASIL; FIB. Enzimas: natureza e ação nos alimentos. **Food Ingredients Brasil**, [s. l.], v. 16, p. 26–37, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.112.2913.495>. Acesso em: 27 jan. 2017.

GAWEL, Erik; PANNICKE, Nadine; HAGEMANN, Nina. A path transition towards a bioeconomy-The crucial role of sustainability. **Sustainability (Switzerland)**, [s. l.], v. 11, n. 11, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/su11113005>

GLOBO, Jornal Nacional Tv. **Rejeitos de fábricas de jeans deixam água do Rio Capibaribe vermelha**. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <http://g1.globo.com/jornal-nacional/noticia/2017/01/rejeitos-de-fabricas-de-jeans-deixam-agua-do-rio-capibaribe-vermelha.html>. Acesso em: 3 mar. 2021.

GÜL, Ülküye Dudu. Bioremediation of Dyes in Textile Wastewater. **Turkish Journal of Scientific Reviews**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 24–28, 2018.

GUSTAVO ADOLFO SAAVEDRA PINTO, UFRJ. **Produção de tanase por *Aspergillus niger***. 207 f f. 2003. - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, [s. l.], 2003. Disponível em: <http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=1053489&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22PINTO, G. A. S.%22&qFacets=autoria:%22PINTO, G. A. S.%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>

JAVED, Urooj; AMAN, Afsheen; QADER, Shah Ali Ul. Utilization of corncob xylan as a sole carbon source for the biosynthesis of endo-1,4- β xylanase from *Aspergillus niger* KIBGE-IB36. **Bioresources and Bioprocessing**, [s. l.], v. 4, n. 1, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0149-5>

KHAN, Sana; MALIK, Abdul. Toxicity evaluation of textile effluents and role of native soil bacterium in biodegradation of a textile dye. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 25, n. 5, p. 4446–4458, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0783-7>

KISHOR, Roop *et al.* Ecotoxicological and health concerns of persistent coloring pollutants of

textile industry wastewater and treatment approaches for environmental safety. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 0–24, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.105012>

KUCHARSKA, Karolina *et al.* Pretreatment of lignocellulosic materials as substrates for fermentation processes. **Molecules**, [s. l.], v. 23, n. 11, p. 1–32, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules23112937>

KUMAR, Deepak *et al.* Application of enzymes for an eco-friendly approach to textile processing. **Environmental Science and Pollution Research 2021**, [s. l.], p. 1–11, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S11356-021-16764-4>. Acesso em: 16 abr. 2022.

LIU, Xi *et al.* Biotransformation ability of endophytic fungi: from species evolution to industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 105, n. 19, p. 7095–7113, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11554-x>

MALGAS, Samkelo *et al.* A mini review of xylanolytic enzymes with regards to their synergistic interactions during hetero-xylan degradation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 35, n. 12, p. 1–13, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2765-z>

MUGDHA, Ambatkar; USHA, Mukundan. Enzymatic Treatment of Wastewater Containing Dyestuffs using Different Delivery Systems. **Sci. Revs. Chem. Commun**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 31–40, 2012.

NNADOZIE, Ebenezer C.; AJIBADE, Peter A. Isotherm, kinetics, thermodynamics studies and effects of carbonization temperature on adsorption of Indigo Carmine (IC) dye using *C. odorata* biochar. **Chemical Data Collections**, [s. l.], v. 33, p. 100673, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CDC.2021.100673>

OTERO, DEBORAH MUROWANIECKI. **ISOLAMENTO, SELEÇÃO E PRODUÇÃO DE LEVEDURAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO PARA PRODUÇÃO DE ENDO-XILANASES DEBORAH MUROWANIECKI OTERO**. [S. l.: s. n.], 2015. ISSN 1098-6596.v. 53E-book.

PATEL, Dharti K. *et al.* Engineering of thermostable phytase–xylanase for hydrolysis of complex biopolymers. **3 Biotech**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 1–9, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02936-z>

PROTZKO, Ryan J. *et al.* Genomewide and Enzymatic Analysis Reveals Efficient d -

- Galacturonic Acid Metabolism in the Basidiomycete Yeast *Rhodospodium toruloides*. **mSystems**, [s. l.], v. 4, n. 6, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/msystems.00389-19>
- PRZYSTAS, Wioletta; ZABLOCKA-GODLEWSKA, Ewa; GRABINSKA-SOTA, Elzbieta. Efficacy of fungal decolorization of a mixture of dyes belonging to different classes. [s. l.], v. 424, p. 415–424, 2015.
- SAHA, Badal C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 30, n. 5, p. 279–291, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S10295-003-0049-X>. Acesso em: 3 out. 2021.
- SAKLI, A. *et al.* Bismuth (III) oxide / carbon nanocomposites for degradation of indigo carmine dye in aqueous solution. **Vacuum**, [s. l.], v. 192, p. 110417, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.VACUUM.2021.110417>
- SANCHES FREIRE, Renato *et al.* **504 QUÍMICA NOVA, 23(4) (2000) NOVAS TENDÊNCIAS PARA O TRATAMENTO DE RESÍDUOS INDUSTRIAIS CONTENDO ESPÉCIES ORGANOCLORADAS.** [S. l.: s. n.], [s. d.].
- SANTOS, Sharline Florentino de Melo. Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. [s. l.], p. 148, 2007.
- SANTOS, Fernando A *et al.* **POTENCIAL DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE ETANOL***Quim. Nova.* [S. l.: s. n.], 1004.
- SARATALE, Rijuta Ganesh *et al.* Textile Industry Wastewaters as Major Sources of Environmental Contamination: Bioremediation Approaches for Its Degradation and Detoxification. **Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety**, Singapore, p. 135–167, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-981-13-1891-7_7
- SHARMA, Diksha *et al.* Greener approach for pulp and paper industry by Xylanase and Laccase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 25, n. April, p. 101604, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101604>
- SHERTATE, R. S.; THORAT, Prakash. BIOTRANSFORMATION OF TEXTILE DYES: A BIOREMEDIATION ASPECT OF MARINE ENVIRONMENT. **American Journal of Environmental Sciences**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 489–499, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3844/AJESSP.2014.489.499>. Acesso em: 16 abr. 2022.
- SKANDA, S. *et al.* Bioremoval capacity of recalcitrant azo dye Congo red by soil fungus *Aspergillus arcoverdensis* SSSIHL-01. <https://doi.org/10.1080/10889868.2021.1984198>, [s.

l.], 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10889868.2021.1984198>. Acesso em: 16 abr. 2022.

SOUZA, Franck da Rosa de. **Aplicação de enzimas no processamento de couros: comparação entre processos químicos e enzimáticos**. 144 f. 2010. - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, Porto Alegre, Brasil, 2010.

SUN, Run Cang; XIAO, Ling Ping; SONG, Guo Yong. Effect of hydrothermal processing on hemicellulose structure. *In: HYDROTHERMAL PROCESSING IN BIOREFINERIES: PRODUCTION OF BIOETHANOL AND HIGH ADDED-VALUE COMPOUNDS OF SECOND AND THIRD GENERATION BIOMASS*. [S. l.]: Springer International Publishing, 2017. p. 45–94. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-56457-9_3

TSOTETSI, Lerato *et al.* Isolation and identification of xylanase producing thermophilic bacteria from compost piles and optimization of xylanase production. **Journal of Biotech Research**, [s. l.], v. 11, n. July, p. 122–132, 2020.

TURHAN, Kadir; TURGUT, Zuhail. Decolorization of direct dye in textile wastewater by ozonization in a semi-batch bubble column reactor. **Desalination**, [s. l.], v. 242, n. 1–3, p. 256–263, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.DESAL.2008.05.005>

VALÉRIA DELGADO BASTOS. Etanol, Alcoolquímica e Biorrefinarias. **BNDES Setorial**, n. 25, mar. 2007, [s. l.], v. 1, p. 1–299, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>. Acesso em: 17 set. 2017.

VOET, Donald; VOET, Judith G. Velocidade das Reações Enzimáticas. *In: BIOQUÍMICA [RECURSO ELETRÔNICO]*. 5ªed. Porto Alegre - RS: Artmed, 2018.

WANG, Jia *et al.* Characterization of efficient xylanases from industrial-scale pulp and paper wastewater treatment microbiota. **AMB Express**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–11, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/S13568-020-01178-1/FIGURES/3>. Acesso em: 16 abr. 2022.

WANG, Jiawei; MINAMI, Eji; KAWAMOTO, Haruo. Thermal reactivity of hemicellulose and cellulose in cedar and beech wood cell walls. **Journal of Wood Science**, [s. l.], v. 66, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s10086-020-01888-x>

WANG, Xiaoxuan; JIANG, Jinming; GAO, Weijun. Reviewing textile wastewater produced by industries: characteristics, environmental impacts, and treatment strategies. **Water Science and Technology**, [s. l.], v. 85, n. 7, p. 2076–2096, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.2166/WST.2022.088>. Acesso em: 16 abr. 2022.

YADU, Aparna *et al.* Realistic Approach for Bioremediation of Heterogeneous Recalcitrant Compounds. *In: COMBINED APPLICATION OF PHYSICO-CHEMICAL & MICROBIOLOGICAL PROCESSES FOR INDUSTRIAL EFFLUENT TREATMENT PLANT.* [S. l.]: Springer Singapore, 2020. p. 237–260. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-981-15-0497-6_11. Acesso em: 4 mar. 2021.

ZUCCA, Paolo *et al.* Fungal laccases as tools for biodegradation of industrial dyes. **Biocatalysis**, [s. l.], v. 1, n. 1, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/BOCA-2015-0007>

5 ARTIGO 1: FUNGAL POTENTIAL FOR THE DECOLORIZATION OF TEXTILE DYES

ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO: INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENT RESEARCH



FUNGAL POTENTIAL FOR THE DECOLORIZATION OF TEXTILE DYES

¹Luana Maria Cavalcanti Teixeira, ¹Thiago Ubiratan Lins e Lins, ²Jackelly Felipe de Oliveira, ²Norma Buarque de Gusmão, ³Leonor Alves de Oliveira da Silva and ^{*1}Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

¹Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências (CB), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Avenida Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP 50670-420, Brazil; ²Departamento de Antibióticos, CB, UFPE, Avenida dos Economistas, S/N, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP 52171-011, Brazil; ³Departamento de Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus I - Jardim Cidade Universitária, João Pessoa- PB, CEP 58051-900 PB - Brazil.

ABSTRACT

The textile dyes used in industry are formed by complex structures with high coloration and are often difficult to treat for decolorization. These dyes, present in high concentration, have a toxic effect on the ecosystem and bioremediation methods using microorganisms cause less toxicity impact on the environment. In this work, four distinct *Aspergillus spp.* strains, capable of decolorizing dyes used in the textile industry, congo red and indigo carmine, diluted in Normal Decolorization Medium, were used. The screening of the best fungus was performed to evaluate the decolorization capacity in liquid medium. The best decolorization results were chosen to carry out the ecotoxicity assays and characterization of the biotreated dye parameters. The four strains evaluated showed a percentage of up to 96.10% of decolorization of the tested dyes. Then, phytotoxicity tests were carried out, which, in comparison with the negative control group, showed significant and promising results, with cucumber seed germination and root growth. The characterization of the dye demonstrated biological oxygen demand (BOD), chemical oxygen demand (COD), turbidity and pH according to established parameters. Therefore, the removal of dyes was achieved through decolorization carried out by fungal microorganisms, and this corresponded to a decrease in the phytotoxicity of congo red.

Key words: Dyes; Decolorization; Microorganisms; Textile Effluents.

*Corresponding authors: laodls@yahoo.com.br; lcbcoelho@gmail.com

INTRODUCTION

Over the years, in parallel to population development, it was detected the generation of large amounts of effluents with different compounds that cause various environmental problems (Thuy *et al.*, 2020). Studies suggest the importance of evaluating different strategies aimed at sustainable development by applying methods capable of treating and mitigating damages caused by textile effluents, including the use of microorganisms and/or active biomolecules of biotechnological interest (Kasiri, 2019; Lellis *et al.*, 2019).

In this context, the water bodies that compose the ecosystem form a final disposal site for various activities from industry, commerce and domestic activities that end up contaminating the environment. The industrial synthetic products are not only toxic to human health, but also to aquatic life, land animals and plants, being harmful in a chain effect throughout the environment (Athira and Jaya, 2018). The textile industry uses a wide range of chemical products, including dyes, which are important constituents, during the different stages of manufacturing, producing a colored wastewater, called textile effluent (Khan and Malik, 2018). Effluents from textile industries are considered one of the largest generators of polluting liquid effluents, discarding tons of textile dyes into the environment. They affect the aquatic ecosystem, soil fertility, plant growth and productivity as well as plant susceptibility to pathogens, that is, the entire development of fauna and flora around where it is being discarded (Saratale *et al.*, 2020).

According to the study by Khan and Malik (2018), the textile industry consumes a huge amount of drinking water, that is, for the production of 1 kg of dyed fabric, about 200

L of water are used. As a result, a large amount of wastewater is discharged into various bodies of water,

generally, without adequate prior treatment, which results in serious pollution of the water containing dyes and other hazardous chemicals generated by the textile industry, such as heavy metals and sulphides (Khan and Malik, 2018).

The textile dyes used in the industry are formed by complex structures with high coloration and are often difficult to treat. Even going through a treatment process to be discarded in water courses, they cause damage to the environment. The dyes present in high concentration have a toxic effect on the ecosystem in addition to not allowing the penetration of sunlight through the water body, inhibiting and harming biological processes (Samchetsabam *et al.*, 2017).

Congo red and indigo carmine are among the most widely used emerging industrial dyes around the world. They are very toxic to the environment and have carcinogenic effects. They are formed by complex aromatic molecular structures and even in small amounts are undesirable because they are difficult to degrade (Ismail *et al.*, 2019).

The CONAMA Resolution n°. 430/11 (Brasil, 2005) provides on the conditions, parameters, standards and guidelines for the discharge of effluents into bodies of water. The effluents resulting from industrial processes, such as those from textile dyeing plants, must be passed through treatment processes before being discarded. The companies that generate these effluents must ensure that the standards required for treatment are within the specifications requested in the resolution. In addition, one of these parameters is that the wastewater from the textile process is decolorized.

Biodegradation or bioremediation is a biological mechanism for recycling waste that can otherwise be used and reused by other organisms. It is one of the possible techniques of easy application that can cause fewer environmental impacts of toxicity (Yadu *et al.*, 2020). The use of bioremediators is a viable option in specific actions for the recovery of the environment,

and for that, in-depth studies are needed on how the manipulation should be done for a better control of its application (Brasil, 2005).

Microorganisms are involved through their enzymatic pathways acting as natural biocatalysts, facilitating the progress of biochemical reactions that degrade the target pollutant. These microorganisms act against pollutants depending on access to a variety of nutritional compounds and generating energy for their growth, replication and activity. The efficiency of bioremediation depends on many factors, including, the chemical nature and concentration of pollutants, the physicochemical characteristics of the environment and its availability for microorganisms (Abatenh et al., 2017).

Fungi or fungal enzymes proved to be potent bioremediators, due to associations resulting from biodegradation or biotransformation of waste (Przystas *et al.*, 2015). They are found in all environments and release extracellular enzymes according to their environmental condition, being able to act easily on any amount of pollutant, even in high concentration, which makes their easy survival (Baghel *et al.*, 2020). Fungi can be excellent candidates for dye removal. Different strains of fungi have been reported to decolorize or biosorb dyes found in textile effluents. Most of them use an extracellular enzyme system that transforms complex substances into more assimilable substances. Fungi are highly studied as bioremediators as they produce non-specific enzymes that efficiently degrade different dyes found in the textile industry (Przystas *et al.*, 2015).

In this context, the present study aims to evaluate the fungal potential in the decolorization of dyes used in the textile industry and analyze the toxicity of the biologically treated dye.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms-growing conditions: *Aspergillus spp.* strains 1, 2, 3 and 4, obtained from the culture collection of the research group of the *Laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial* (LAMAI-UFPE), were multiplied under culture conditions in a liquid Sabouraud medium (glucose 0.4 g; agar 1.5 g; distilled water, 100 ml) incubated for 120 h at 30 °C in stationary condition and, subsequently, inoculated in solid Sabouraud medium and incubated for 168 h, at 30 °C.

Dyes: Commercial indigo carmine dyes (5.5'-indigodisulfonic acid sodium salt, indigoid sulfonate class, CI: 73015) Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA and congo red (sodium salt of benzidine diazo-bis-1-naphthyl amine-4-sulphonic acid, diazo-sulfonate class) Cromato Chemical Products Corporation, Diadema, São Paulo, Brazil, were used. Aqueous solutions in ultrapure water were prepared, for the dissolution of the dyes (synthetic effluents), at a concentration of 25 ppm.

Screening of decolorization in liquid medium:

Screening to assess the decolorization capacity in liquid medium was performed in 250 ml Erlenmeyer flasks, containing 60 ml of modified Normal Decolorization Medium (NDM), consisting of: 0.25% yeast extract, 2% glucose and 25 ppm of textile dye, inoculated with 6 discs of fungal mycelium with a diameter of 9 mm, cultivated in Sabouraud agar, after 7 days of cultivation. Flasks were kept for 192 h at 25 °C in biological oxygen demand (BOD). The assays were performed in triplicate, the control assay was performed using the NDM culture medium, added with dye without the inoculum of the fungal strains, and, every 24 h, 1 ml aliquots were removed and centrifuged for 20 min at 5,000 rpm (Ramalho *et al.*, 2004). The percentage of decolorization was calculated according to the equation:

$$D = \left(\frac{AbsCTRL - AbsTEST}{AbsCTRL} \right) \times 100$$

D% = decolorization percentage.

AbsCTRL= absorbance of the control at 610 nm for indigo carmine and 497 nm for congo red.

AbsTEST = absorbance with fungal treatment at 610 nm for indigo carmine and 497 nm for congo red.

The maximum absorbance length for the readings was determined by mass spectrometer in the visible range from 195 to 1100 nm.

Phytotoxicity assay: For the phytotoxicity tests, 10 cucumber seeds (*Cucumis sativus L.*) were employed per plate. Deionized water was used as a positive control, and dyes at 25 ppm were applied as a negative control. The seeds were placed in Petri dishes (9.5 cm in diameter) with qualitative filter paper substrate (porosity 1 µm) and moistened with 5 ml of the biotreated dye. To maintain moisture, the Petri dishes were wrapped up in paper film and incubated in BOD for 7 days at 25°C (Table 1). At the end of the experimental period, the number of germinated seeds was evaluated, considering only those that presented root protrusion. Test solutions were prepared with deionized water. The methodology and statistics were performed from Tiquia (1996), modified (Tiquia *et al.*, 1996).

Table 1. Specifications for the phytotoxicity assay of textile dyes with *Cucumis sativus* seeds to obtain % G, % CR and IG

Parameters	Condition
Seed species	<i>C. sativus</i>
Seed disinfection	By immersion in a solution of distilled water and 2% commercially available sodium hypochlorite for 3 to 5 min. Then with 6 passes of autoclaved deionized water.
Incubation	Static, 25°C for 7 days in Petri dishes containing paper filters as the wet substrate for growth.

Wetting	Every 48 h, 5 ml
Light quality	Dark
Chosen biotreatments	4 treatments indigo carmine, 4 treatments congo red, filtered in a syringe filter.
Replicates	3
Controls	Positive: only water Negative: 25 ppm dye diluted in water.
Endpoint	Count the number of sprouts and measurement of roots.
Not acceptable	Ungerminated and less than 65% growth.
Formulas for calculations	Germination percentage (% G) = Average of germinated test seeds X 100/ Average of germinated control seeds. Root growth percentage (% CR) = Average of growth of test seeds X 100/ Average of root growth in the control. Germination index (GI) = (Seed germination) X (% Root growth)/100 Root growth percentage (% CR) = Average of root growth of test seeds X 100/ Average of root growth in the control. Germination index (GI) = (Seed germination) X (% Root growth)/100

Biological Oxygen Demand (BOD) and Chemical Oxygen Demand (COD):

To carry out the tests of this methodology, we based our efforts on the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (Rice *et al.*, 2017), for BOD and chemical oxygen demand (COD). The tests were carried out by the *Instituto de Tecnologia de Pernambuco* – ITEP. To obtain the results of COD, it was necessary to dilute the sample 100 times.

The samples chosen to perform BOD and COD were the ones that obtained the best results in congo red decolorization and phytotoxicity. The pH and turbidity of all tested samples were also verified.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Every production process is followed by the generation of waste, and among the various technologies investigated in waste cleaning, bioremediation emerged as the most desirable approach to decontaminate many environmental pollutants. The ability of microorganisms to transform a variety of chemicals has led to their use in bioremediation processes (Bhattacharya et al., 2011). Several microorganisms, therefore, are being studied to develop their degradative abilities in the remediation of pollutants.

In this context, the present work shows the decolorization analysis of the two textile dyes, congo red and indigo carmine, by the 4 different *Aspergillus spp.* strains, as shown in Figure 1. The best result for congo red dye decolorization was 96.1%, using strain 4 in 72 h of incubation at 25°C. The other three strains used in this work also showed high decolorization rates (94.75% to 96.10%) in the same cultivation time (72 h), Figures 1 and 2. Amen et al. (2021), evaluating the degradation of azo dyes, found that *Aspergillus* strains decolorized 85% of the dyes in synthetic wastewater containing congo red. Assis et al (2018) obtained 98% decolorization of congo red at 25 ppm after 144 h of treatment using *A. niger*. Mohammed et al., (2015), in studies with *A. terreus* and *A. flavus* for the biodegradation of congo red dye, obtained a percentage of 46.89% after 72 h of incubation. Thus, it can be referred that fungal species have been presented as potential candidates for removal of congo red from textile wastewater and its safe disposal.

Azo dyes are toxic and recalcitrant environmental pollutants in wastewater and soil, and are widely used in the textile industry; among these dyes is congo red. Due to its high toxicity, several decolorization studies were able to find fungal species useful in wastewater treatment and soil remediation efforts (de Almeida et al., 2021; Sumera AfzalKhan et al., 2020).

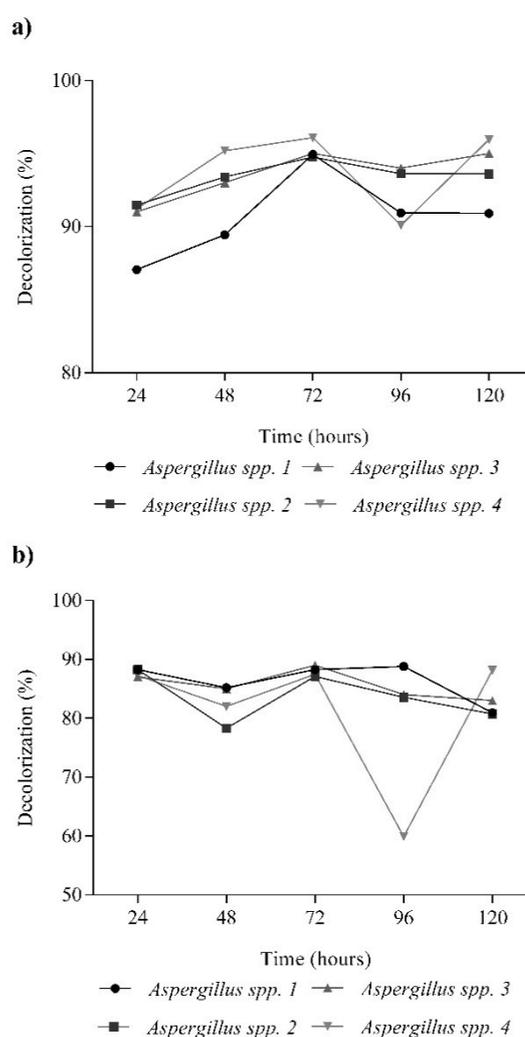


Figure 1. Kinetics of textile dye decolorization in MND culture medium inoculated with *Aspergillus* spp. strains 1, 2, 3 and 4; (a) congo red at 25 ppm and (b) indigo carmine at 25 ppm. $T = 25^{\circ}\text{C}$.

Throughout the indigo carmine screenings, a decolorization of more than 80% was noted from the second day (48 h) of incubation. A slight drop in the effluent decolorization activity throughout the experiment, with the activity in the 4 selected microorganism strains allowed above 80% of bioremediation (Figure 2).

(A)



(B)

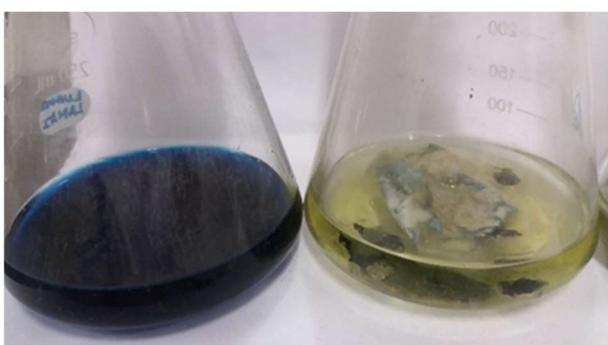


Figure 2. *Aspergillus* spp. 4 - Decolorization of (A) congo red and (B) indigo carmine dyes.

In plants, water plays an important role in regulating biotic and abiotic stress responses caused by contaminants (Wang *et al.*, 2019). Toxicity assays are of great importance and should be carried out after microbial decolorization tests. These assays provide insight into the physiological impact of contaminants on crops, to design more appropriate treatments for contaminants (Werrie *et al.*, 2020).

The removal of the color from the dyes by the fungal strains led to a decrease in toxicity in the growth of cucumber seeds from the culture solution after the decolorization process. The control results, in both textile dyes used, were characterized as toxic, since they showed the lowest growth compared to the others. According to Tiquia (1994), GI values above 80% indicate the reduction or elimination of toxic effects in the decolorization process.

The best congo red decolorization conditions were displayed in the phytotoxicity test; it was

demonstrated that fungal strains had better results with the culture solutions after the congo red decolorization process (Figure 3).

These results showed that even with satisfactory decolorizations of the culture solutions, the indigo carmine treatments were not adequate for the phytotoxicity assays. Considering ecotoxicity tests, the absence of color does not necessarily translate into the absence of toxicity (de Almeida *et al.*, 2021). There was germination of more than 80% of the seeds of *C. sativus* (Figure 3a and 4a). If compared to the positive and negative control group, there is a promising improvement in germination after bioremediation with the four strains. In the root growth, nuances were verified in the different fungi compared to the control groups, since they were biotreated dyes from four different *Aspergillus* spp. strains. A significant growth was detected in germinated seeds when compared to the negative control group (Figure 3b). Finally, the germination indices were also satisfactory, since the indices of the negative control group are lower when compared to the groups after bioremediation.

The germination, root growth and germination index percentage represented in Figure 4 showed a satisfactory and higher growth percentage when compared to the 100% germination negative control group. However, throughout the growth test there was no root development and growth.

The germination index was satisfactory under all conditions of the culture solution after the congo red decolorization process by fungal strains. A decrease in toxicity due to root growth was confirmed when compared to the control group. All four strains tested for congo red decolorization showed promise both in color removal and in the detoxicity in the growth of cucumber seeds (figure 5 and 6). However, evaluating the results of the toxicity tests of cucumber seeds with the culture solution after the process of decolorization

of indigo carmine, it was not possible to detect promising results in seed growth (figure 6).

In other studies, such as Przystal (2018), it was shown that there is a decrease in the toxicity of dyeing solutions after the fungal decolorization processes. Then, decolorization significantly reduces the negative influence of textile dyes on plant germination, root and stem growth. Similar results were reported using the yeast *Pichia kudriavzevii* SD5 for decolorization, in the tests by Delane and collaborators (2020); the results effectively demonstrated that there was a reduction in dye decolorization and also a reduction in toxicity rates.

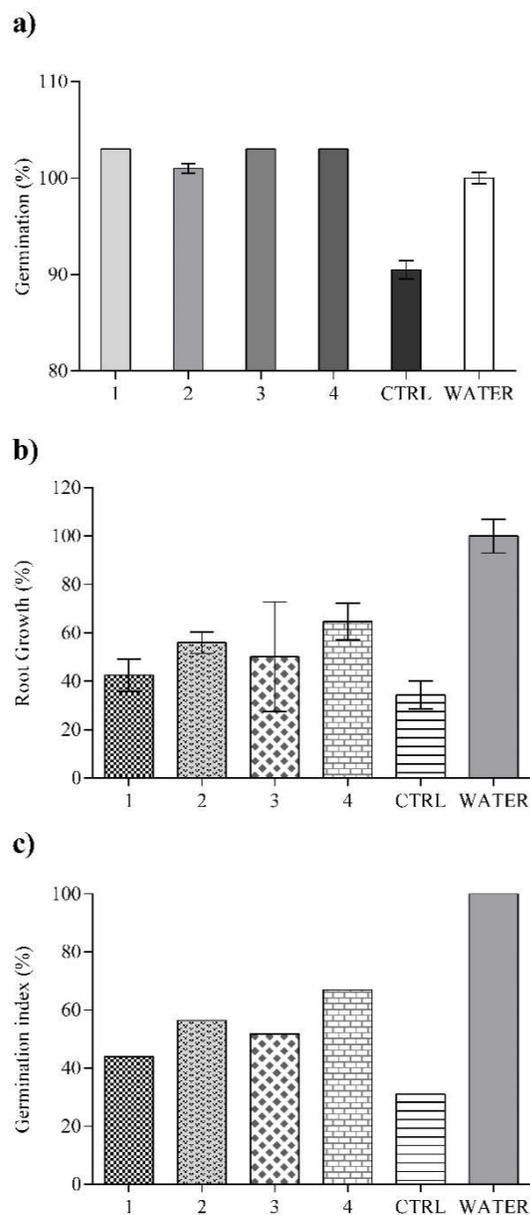


Figure 3. Congo red phytotoxicity assay. (a) Germination percentage, (b) root growth percentage, (c) germination index. *Aspergillus* spp. strains 1, 2, 3 and 4; CTRL = control.

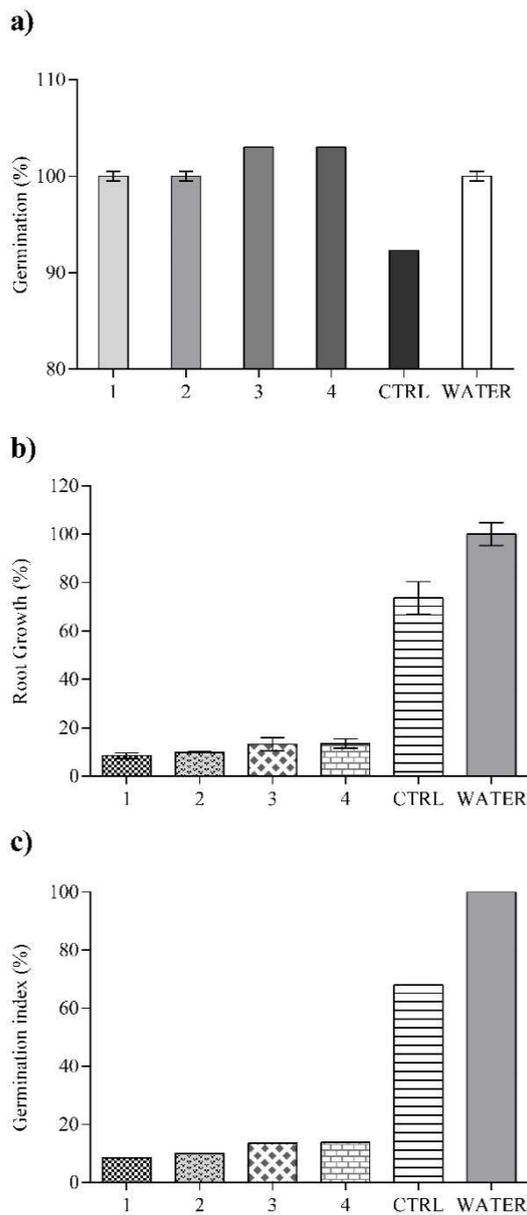


Figure 4. Indigo carmine Phytotoxicity Assay. (a) Germination percentage, (b) root growth percentage, (c) germination index. *Aspergillus* spp. strains 1, 2, 3 and 4; CTRL = control.

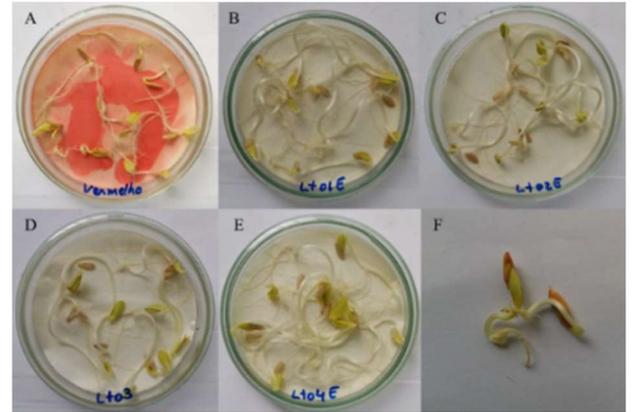


Figure 5. Cucumber seed phytotoxicity assays. Using the culture solutions after the Congo red decolorization process. A-negative control, B-strain 1, C-strain 2, D-strain 3, E-strain 4 and F-atrophy of the roots of the negative control.

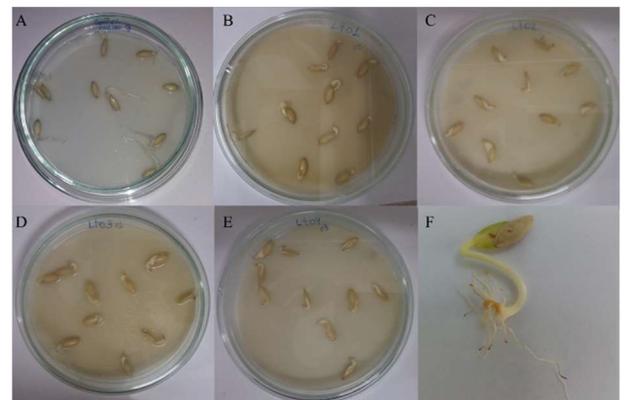


Figure 6. Cucumber seed phytotoxicity assays using the culture solutions after the Indigo carmine decolorization process. A-negative control, B-strain 1, C-strain 2, D-strain 3, E-strain 4 and F-atrophy of the roots of the negative control.

Textile effluents can only be released directly or indirectly if they are properly treated and comply with standard norms. The pH of most samples throughout the decolorization was kept in accordance with the parameters established by CONAMA in art. 16 and 17, of class 3 and 4 waters, indicated by pH values obtained between 6 and 9. Only strain 2 showed a low pH (Table 2) (Brasil, 2005). The pH values did not show any sharp differences during the incubation period. On the other hand, turbidity values increased progressively. Even though the absorbances showed low values of decolorization throughout the experiment, the values obtained were high. This is

due to the fact that the fungal strains developed in the decolorization medium and even performing their decolorizing activity, the turbidity becomes progressively high due to the fungal growth, making unachievable the necessary transparency for the collection of lower values (Table 2).

Since the main objective of the treatment of textile, effluent waters significantly reduced the amount of organic matter that can be measured, this organic matter must be converted into inert mineralized products under controlled conditions and high variations. Given this information, the two most common parameters used to recognize the composition of effluent water were tested: BOD and COD. BOD is a measure of how dissolved oxygen is consumed by aerobic bacteria in 5 days at 20 °C, which indirectly assesses the concentration of biodegradable organic matter in water through the oxygen demand produced by microorganisms in respiration. COD is the measured chemical oxygen demand, being an indicator of organic matter that is based on the concentration of oxygen consumed to oxidize the organic matter present in the studied medium, in an acidic medium and under energetic conditions of a strong oxidizing chemical agent (Abdalla and Hammam, 2014; Mohsenpour *et al.*, 2021; Valente *et al.*, 1997).

When considered the strains that stood out the most in the BOD and COD parameters, we can highlight strains 2 and 3 for having lower values (Table 2). High COD values indicate the presence of substances capable of consuming oxygen, for example, Fe^{2+} , Mg^{2+} e NH_4 (Fenzl, 1988; Pizato *et al.*, 2017). In addition, the results indicate that the dyes used have low biodegradability, as the BOD and COD values are very far from each other (Pizato *et al.*, 2017; Von Sperling, 2005). The presence of organic matter in high concentrations can cause deleterious effects on the concentration of dissolved oxygen, the trophic state and the well-being of the fauna and flora

of the water (Mohsenpour *et al.*, 2021). Thus, making a correlation between BOD and COD becomes a useful tool to assess the conditions of the effluent and as an indicator of biodegradation capacity. The ratio between the two parameters (BOD/COD) is called the biodegradability index (BI) and is used as a cut-off point between biodegradable and non-biodegradable waste. Analyzing the results of the physicochemical determinations presented in Table 2, it was observed that the BI obtained for each of the strains was well below the recommended values for different types of waste. Strains 2 and 3 stood out in relation to the other two strains and to the control conditions (Table 2). Generally, the BOD/COD ratio is typically 0.5:1 (0.5) for raw domestic effluents, and can reach 0.1:1 (0.1) for a well-stabilized secondary effluent, as is the case of the tested samples. Thus corroborating to show that the strains were efficient in decolorization when kept under well-established test conditions, in order to assess their capacity to improve effluent water quality. However, biodegradability index values can range from 0.4 to 0.8 for raw municipal effluents. Ratio may exceed 10 for industrial effluents (Abdalla and Hammam, 2014). Thus, with the results presented, it is necessary to elucidate the substances present in the experiment and which, directly and indirectly, influenced the BOD and COD values.

Table 2. Results of the analysis of Biological and Chemical Oxygen Demand (BOD and COD) with pH and turbidity of congo red dye treated with the strains described and positive and negative controls for comparison.

Samples	BOD (x10 ³)	COD (x10 ⁴)	BI ((BOD/ COD)x 10 ⁻²)	pH	Turbidity
1	4.92	4.0	12.3	6.13	18.40
2	0.2	3.6	0.6	5.50	16.70
3	0.1	5.4	0.2	6.26	39.70
4	4.42	5.8	7.6	6.06	28.10
CTRL1 +	1.61	5.6	2.9	6.46	18.80
CTRL1 -	2.01	2.0	10.1	6.45	6.19

Aspergillus spp. strains 1, 2, 3 and 4; CTRL = control.

CONCLUSION

The decolorization by the *Aspergillus spp.* strains used showed values according to the quality parameters. More specific studies are still needed for the introduction of this treated effluent in waters below class 4, with the objective that their disposal in the environment will not be harmful neither to consumption nor to human contact, or to fauna and flora. It was demonstrated that the strains decolorized the textile industrial dyes achieving the purpose of the article. Research in this area of textile effluents should be encouraged and, consequently, expanding the number of parameters analyzed, covering more specific characteristics, in order not to harm the environment.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are grateful to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for fellowship (LCBBC) and the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) for funding the development of this work.

REFERENCES

Biochemical Oxygen Demand and Chemical Oxygen Demand for Various Wastewater Treatment Plants in Egypt to Obtain the Biodegradability

- Indices. *Int J Sci Basic Appl Res* 13: 42–48.
- Athira N, Jaya DS (2018). The Use of Fish Biomarkers for Assessing Textile Effluent Contamination of Aquatic Ecosystems: A Review. *Nat Environ Pollut Technol An Int Q Sci J* 17: 25–34.
- Baghel S, Sahariah BP, Anandkumar J (2020). Bioremediation of Lignin-Rich Pulp and Paper Industry Effluent. In *Combined Application of Physico-Chemical & Microbiological Processes for Industrial Effluent Treatment Plant* Springer Singapore, Singapore, pp. 261–278.
- Brasil (2005). Resolução CONAMA N° 357, De 17 De Março De 2005* (Retificada). *Cons Nac do Meio Ambient*: 36. Available at: https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res_conama_357_2005_classificacao_corpos_agua_rtfcd_a_ltr_d_res_393_2007_397_2008_410_2009_430_2011.pdf.
- de Almeida AP, Macrae A, Ribeiro BD, Do Nascimento RP (2021). Decolorization and detoxification of different azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* ME-446 under submerged fermentation. *Brazilian J Microbiol* 52: 727–738.
- Delane EI, Evangelista-Barreto NS, Cazetta ML (2020). Levedura *Pichia kudriavzevii* SD5 como biocatalizador na descoloração do corante Preto Reativo 5. *Eng Sanit e Ambient* 25: 361–369.
- Fenzl N (1988). Composição química das águas naturais. In *Introdução à hidrogeoquímica* (Ed. N Fenzl). Gráfica e Editora Universitária (UFPA), Belém - PA, pp. 49–74.
- Ismail M, Akhtar K, Khan MI, Kamal T, Khan MA, M. Asiri A, Seo J, Khan SB (2019). Pollution, Toxicity and Carcinogenicity of Organic Dyes and their Catalytic Bio-Remediation. *Curr Pharm Des* 25: 3645–3663.
- Kasiri MB (2019). Application of chitosan derivatives as promising adsorbents for treatment of textile wastewater. In *The Impact and Prospects of Green Chemistry for Textile Technology* (Eds Shahid-ul-Islam and BS Butola). Elsevier, pp. 417–469.
- Khan S, Malik A (2018). Toxicity evaluation of textile effluents and role of native soil bacterium in biodegradation of a textile dye. *Environ Sci Pollut Res* 25: 4446–4458.
- Lellis B, Fávaro-Polonio CZ, Pamphile JA, Polonio JC (2019). Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms. *Biotechnol Res Innov* 3: 275–290.
- Mohsenpour SF, Hennige S, Willoughby N, Adeloje A, Gutierrez T (2021). Integrating micro-algae into wastewater treatment: A review. *Sci Total Environ* 752: 142168.

- Pizato E, Lopes AC, Rocha RDC, Barbosa A de M, Cunha MAA da (2017). Caracterização de efluente têxtil e avaliação da capacidade de remoção de cor utilizando o fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI. *Eng Sanit e Ambient* 22: 1027–1035.
- Przystas W, Zablocka-Godlewska E, Grabinska-Sota E (2015). Efficacy of fungal decolorization of a mixture of dyes belonging to different classes. 424: 415–424.
- Przystas W, Zablocka-Godlewska E, Grabińska-Sota E (2018). Efficiency of decolorization of different dyes using fungal biomass immobilized on different solid supports. *Brazilian J Microbiol* 49: 285–295.
- Rice roger b baird, Stone andrew d, W. E (2017). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 23rd ed., Ed. WEF American Public Health Association, American Water Works Association. Water Environment Federation, American Public Health Association, American Water Works Association.
- Samchetshabam G, Choudhury TG, Gita S (2017). Impact of Textile Dyes Waste on Aquatic Environments and its Treatment. *Environ Ecol* 35: 2349–2353.
- Saratale RG, Rajesh Banu J, Shin H-S, Bharagava RN, Saratale GD (2020). Textile Industry Wastewaters as Major Sources of Environmental Contamination: Bioremediation Approaches for Its Degradation and Detoxification. *Bioremediation Ind Waste Environ Saf*: 135–167.
- Sumera Afzalkhan, Saadat Mehmood, Nabeela, Amjad Iqbal MH (2020). Industrial polluted soil borne fungi decolorize the recalcitrant azo dyes Synozol red HF–6BN and Synozol black B. *Ecotoxicol Environ Saf* 206: 111381.
- Thuy PT, Tuan PT, Huyen DTT, Khai NM (2020). Insights of environmental impact assessment reports for industrial parks: wastewater quantity prediction aspect. *Environ Monit Assess* 192.
- Tiquia SM, Tam NFY, Hodgkiss IJ (1996). Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. *Environ Pollut* 93: 249–256.
- Valente JPS, Padilha PM, Silva AMM (1997). Oxigênio dissolvido (OD), demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) como parâmetros de poluição no ribeirão Lavapés/Botucatu - SP. *Eclética Química* 22: 49–66.
- Von sperling M (2005). *Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos*, 3ª., Ed. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Editora UFMG, Belo Horizonte - MG, Brasil.
- Wang Q, LI C, Wang Y, Que X (2019). Phytotoxicity of graphene family nanomaterials and its mechanisms: A review. *Front Chem* 7: 292.
- Werrie P-Y, Durenne B, Delaplace P, Fauconnier M-L (2020). Phytotoxicity of Essential Oils: Opportunities and Constraints for the Development of Biopesticides. A Review. *Foods* 9: 1–24.
- Yadu A, Satapathy M, Sahariah BP, Anandkumar J (2020). Realistic Approach for Bioremediation of Heterogeneous Recalcitrant Compounds. In *Combined Application of Physico-Chemical & Microbiological Processes for Industrial Effluent Treatment Plant* Springer Singapore, pp. 237–260.

**6 ARTIGO 2: POTENCIAL DE XILANASES POR FUNGO XILANOLÍTICO-
PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL**

ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO: “ENZYME AND MICROBIAL
TECHNOLOGY”



ISSN: 0141-0229

CLASSIFICAÇÃO DOS PERIÓDICOS NO QUADRIÊNIO 2013 – 2016 : “B1”

Enzyme and Microbial Technology
IMPROVED PRODUCTION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF XYLANASE BY
Aspergillus fumigatus UNDER FERMENTATION IN LIQUID STATE
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Keywords:	xylanase; Aspergillus fumigatus; partial characterization; enzymatic extract; xylanolytic production
Corresponding Author:	Thiago Ubiratan Lins e Lins, Ph.D. Faculdade Facottur: Faculdade de Comunicacao e Turismo de Olinda Olinda, PE BRAZIL
First Author:	Luana Maria Cavalcanti Teixeira, Master
Order of Authors:	Luana Maria Cavalcanti Teixeira, Master Thiago Ubiratan Lins e Lins, Ph.D. Raphael Carlos Ferrer de Santana, Ph.D. Leonor Alves de Oliveira da Silva, Ph.D. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, Ph.D.
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL
Abstract:	The production of xylanase by an Aspergillus sp. was optimized using an experimental design in liquid state fermentation. Different fermentation parameters such as temperature, initial pH and amount of substrate were investigated at an individual level. All selected fermentation parameters influenced xylanase production. The amount of substrate was the parameter with the greatest influence on xylanase production at an individual level. The identification of the microorganism was performed by MALDI-TOF, confirming it to be an Aspergillus fumigatus by the spectra of the BioTyper™ database. The analyzes carried out after 72 h of fermentation stated that assay 8 obtained the best activity indexes (pH 8, 35 °C, 1 % of substrate), which is the best condition for xylanolytic production. The enzymatic extract showed a stable plateau between 4 and 5 in pH tests, in addition to demonstrating enzymatic activity at pH 7. Stability was maintained at different pH for 24 h. The best enzyme production temperature was evaluated at 60 °C and it demonstrated stability at different temperatures and incubation times. It was subjected to enzymatic activity on different substrates confirming the activity by birchwood xylan. When analyzing the results, it was possible to notice that the increase in the substrate concentration (0.25 to 1.0%) had a significant influence on the use of the substrate by the enzyme. After performing SDS-PAGE and zymogram using birchwood xylan, it was possible to trace a protein profile present in the microbial extract. A. fumigatus demonstrated to be a promising candidate in the production of xylanases.
Suggested Reviewers:	Patricia Melchionna Albuquerque patialbuq@gmail.com Norma Buarque Gusmão nbg@ufpe.br Rafael Lopes Oliveira loprafa@gmail.com

COVER LETTER

1. Title: IMPROVED PRODUCTION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF XYLANASE BY *Aspergillus fumigatus*. UNDER FERMENTATION IN LIQUID STATE
2. Authors and affiliations
 - ^aLuana Maria Cavalcanti Teixeira
 - ^bThiago Ubiratan Lins e Lins
 - ^cRaphael Carlos Ferrer de Santana
 - ^dLeonor Alves de Oliveira da Silva
 - ^aLuana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

^aDepartamento de Bioquímica, Centro de Biociências (CB), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Avenida Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50670-420, Brasil;

^bFaculdade Facottur. Avenida Getúlio Vargas, 1360, Bairro Novo, Olinda-PE, CEP: 53030-010, Brasil;

^cUninassau Recife. Rua Guilherme Pinto, 114, Graças, Recife – PE, CEP: 52011-210

^dDepartamento de Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus I - Jardim Cidade Universitária, João Pessoa- PB, CEP: 58051-900, Brasil.
3. Corresponding author contact information
 - 3.1. Full name:
Thiago Ubiratan Lins e Lins
 - 3.2. E-mail address:
thiago.ubiratan.lins@gmail.com
 - 3.3. Phone number:
+5581988521552
 - 3.4. Postal address:
Rua Veneza, 110 – Bloco 6 – Apto 503 – Centro – Paulista – Pernambuco – Brasil.
4. Number of display items (figures and tables)
 - 8 figures
 - 4 tables

AUTHOR AGREEMENT

We wish to confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication and there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome.

We confirm that the manuscript has been read and approved by all named authors and that there are no other persons who satisfied the criteria for authorship but are not listed.

We further confirm that the order of authors listed in the manuscript has been approved by all of us.

We confirm that we have given due consideration to the protection of intellectual property associated with this work and that there are no impediments to publication, including the timing of publication, with respect to intellectual property. In so doing we confirm that we have followed the regulations of our institutions concerning intellectual property.

We understand that the Corresponding Author is the sole contact for the Editorial process (including Editorial Manager and direct communications with the office). He is responsible for communicating with the other authors about progress, submissions of revisions and final approval of proofs.

We confirm that we have provided a current, correct email address which is accessible by the Corresponding Author and which has been configured to accept email from thiago.ubiratan.lins@gmail.com

Signed by all authors as follows:

10-04-2022 Luana Maria Cavalcanti Teixeira
10-04-2022 Thiago Ubiratan Lins e Lins
10-04-2022 Raphael Carlos Ferrer de Santana
10-04-2022 Leonor Alves de Oliveira da Silva
10-04-2022 Luana Cassandra Breitenbach
Barroso Coelho

Highlights (for review)

HIGHLIGHTS

The *A. fumigatus* identification presents scores of 2.038 and 1.99 in MALDI-TOF MS

The enzyme complex showed a pH plateau between 4 and 5 and enzymatic activity at pH 7

The xylanolytic enzyme showed an temperature between 50 - 70 °C

The enzyme showed better compatibility with birchwood xylan, as expected

Compatibility test showed that enzyme had activity in presence of powder detergents

Distinct bands were obtained on the electrophoresis gel and confirmed with zymography

ABSTRACT

The production of xylanase by an *Aspergillus* sp. was optimized using an experimental design in liquid state fermentation. Different fermentation parameters such as temperature, initial pH and amount of substrate were investigated at an individual level. All selected fermentation parameters influenced xylanase production. The amount of substrate was the parameter with the greatest influence on xylanase production at an individual level. The identification of the microorganism was performed by MALDI-TOF, confirming it to be an *Aspergillus fumigatus* by the spectra of the BioTyper™ database. The analyzes carried out after 72 h of fermentation stated that assay 8 obtained the best activity indexes (pH 8, 35 °C, 1 % of substrate), which is the best condition for xylanolytic production. The enzymatic extract showed a stable plateau between 4 and 5 in pH tests, in addition to demonstrating enzymatic activity at pH 7. Stability was maintained at different pH for 24 h. The best enzyme production temperature was evaluated at 60 °C and it demonstrated stability at different temperatures and incubation times. It was subjected to enzymatic activity on different substrates confirming the activity by birchwood xylan. When analyzing the results, it was possible to notice that the increase in the substrate concentration (0.25 to 1.0%) had a significant influence on the use of the substrate by the enzyme. After performing SDS-PAGE and zymogram using birchwood xylan, it was possible to trace a protein profile present in the microbial extract. *A. fumigatus* demonstrated to be a promising candidate in the production of xylanases.

CREDIT AUTHOR STATEMENT

Luana Maria Cavalcanti Teixeira: Writing - Original Draft / Visualization / Investigation / Data Curation /

Thiago Ubiratan Lins e Lins: Writing - Original Draft / Visualization / Investigation / Formal analysis / Software /

Raphael Carlos Ferrer de Santana: Writing - Original Draft / Visualization / Investigation / Formal analysis / Software /

Leonor Alves de Oliveira da Silva: Conceptualization / Resources / Writing - Review & Editing / Supervision / Project administration / Methodology / Validation

Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho: Conceptualization / Writing - Review & Editing / Supervision / Project administration / Funding acquisition

7 ARTIGO 3: Xylanase from *Aspergillus fumigatus*

Xylanase from *Aspergillus fumigatus*

Luana Maria Cavalcanti Teixeira, Viviane Brito Nogueira, Rafael Castro de Araújo, Sarah Signe do Nascimento, Thiago Ubiratan Lins e Lins, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho e Leonor Alves de Oliveira ,

ABSTRACT

Xylanases are produced by microorganisms of many genus among that the *Aspergillus* species and they are capable to catalyzes the xylan to oligosaccharides being used to many different applications. In order to identify, purify and characterize the main xylanolytic enzyme excreted in liquid fermentation medium, the *Aspergillus fumigatus* was isolated from soil Amazon rainforest. It was assayed DNA isolation and PCR sequencing confirming the species. The fungal strain was maintained in solid medium to produce xylanases were purified from the crude filtrate after growth in Vogel liquid medium pH 5.5 with 1% (w/v) corncob as sole carbon source. The activity was associated with the fraction precipitated at 70% saturation. After this, xylanase was purified with final specific activities of 1,053.0 U.mg prot.⁻¹ and 7.4-fold purification, respectively. Molecular weight was found by SDS-PAGE revealing one 25.33 kDa. molecular weight protein. The enzyme purified showed an activity profile in slightly acid region pH 4.5-5.5 with optimal activity at pH 5.0, maintaining relative activity above 99%. Furthermore, the enzyme its activity in a 4.0 to 6.5 pH range with relative activity above 80% at pH range 4.0 to 5.5. The ideal temperature conditions 45 and 55 °C with maintenance activity, achieving closer to 100%. Additionally, the enzyme exhibited kinetic parameters according to Michaelis-Menten kinetics. The xylanase produced demonstrated highlighted stability and activity according the results achieved and related in literature and the microorganism can be more explored to achieve goals like processing of xylanolytic waste in order to reduce ambiental pollution.

Key words: xylanases; *Aspergillus fumigatus*;

Key words: xylanases; *Aspergillus fumigatus*;

8 CONCLUSÕES

Durante a execução desse trabalho, o *Aspergillus fumigatus* foi testado e teve sua atividade confirmada, sendo um microrganismo capaz de realizar atividade de descoloração a partir da produção de xilanases. Todos os ensaios realizados demonstraram que o microrganismo foi viável e versátil quanto aos resultados apresentados. O microrganismo se mostrou um bom despoluente de águas quando conseguiu absorver os corantes testados. Esse resultado só mostra o quanto fungos podem ser úteis para o desenvolvimento de soluções de despoluição sem o uso de substâncias químicas. Essa atividade assim como o potencial enzimático em conjunto com detergentes industriais podem ser mais explorados a fim de se obter uma aplicação industrial e comercial.

9 ANEXOS

9.1 Atividades publicadas realizadas em paralelo com a professora coorientadora Dr. Leonor Alves de Oliveira da Silva.

9.1.1 Artigos

Brazilian Journal of Development

Atividade antioxidante e antimicrobiana de *Streptomyces hygroscopicus*

Antioxidant and antimicrobial activity of *Streptomyces hygroscopicus*

DOI:10.34117/bjdv6n8-069

Recebimento dos originais: 08/07/2020

Aceitação para publicação: 10/08/2020

Jackelly Felipe de Oliveira

Biotechnologista pela Universidade Federal da Paraíba, Mestranda em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pernambuco
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Antibióticos
Rua Prof. Artur de Sá s/n Cidade Universitária, Recife – PE – Brasil
E-mail: Jackellyfo33@gmail.com

Maria Luiza de Sousa Silva

Graduanda em Biomedicina na Universidade Federal da Paraíba
Instituição: Universidade Federal da Paraíba - Campus I
Jardim Universitário, S/N - Castelo Branco, João Pessoa, PB, 58051-900
E-mail: smariasluiza2017@gmail.com

Luana Maria Cavalcanti Teixeira

Doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia (PGBqF) pela
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco
Rua Prof. Artur de Sá s/n Cidade Universitária, Recife – PE – Brasil
E-mail: luana_tsuki@hotmail.com

Leonor Alves de Oliveira da Silva

Doutora em Microbiologia Aplicada pela Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho
Professora Adjunta da Universidade Federal de Pernambuco Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Antibióticos, Rua Prof. Artur de Sá s/n Cidade Universitária Recife-PE – Brasil
E-mail: laodls@yahoo.com.br

RESUMO

Os metabólitos secundários oriundos dos microrganismos são compostos de grande interesse industrial, farmacêutico e agrônomico. Os metabólitos secundários podem ser utilizados para crescimento ou exercem outras funções como a inibição de outros microrganismos, bem como compostos com propriedades antioxidantes. Dentre os microrganismos mais estudados quanto à produção dessas substâncias estão as Actinobactérias. Este trabalho teve como objetivo analisar a bioatividade especificamente a capacidade antioxidante e antifúngica do extrato oriundo da bactéria *Streptomyces hygroscopicus* na qual foi utilizado uma fermentação submersa em meio MPE e utilizar acetato de para extração dos seus biocompostos. Inicialmente a atividade antioxidante do extrato acetato de etila foi realizada pelo método ABTS detectando uma inibição do radical ABTS de 29,15%. Ao realizar a atividade antioxidante do extrato através do método de DPPH, obtivemos os seguintes valores de IC50 de $0,565 \pm 0,028$ mg/mL. Em ensaios da atividade antifúngico por

Brazilian Journal of Development

difusão em poço, o extrato apresentou inibição apenas nos apenas aos fungos *Fusarium oxysporum* e URM5522, com halos de inibição correspondente a 2,5 cm.

Palavras-chave: Actinobacteria, antifúngico, extrato da biomassa.

ABSTRACT

The secondary metabolites derived from microorganisms are compounds of great interest in several areas. Secondary metabolites may be used for growth or other functions such as inhibition of other microorganisms and can display antioxidants properties. The actinobacteria is the main microorganism that shows production of these substances. This work aimed to analyze the bioactivity specifically the antioxidant and antifungal capacity of the extract from the bacterium *Streptomyces hygroscopicus* in which a submerged fermentation was used in MPE medium and use acetate to extract its biocomposites. Initially the antioxidant activity of the ethyl acetate extract was performed by the ABTS method, detecting an ABTS radical inhibition of 29.15%. When carrying out the antioxidant activity of the extract through the DPPH method, we obtained the following IC 50 values of 0.565 ± 0.028 mg / mL. In antifungal tests by well diffusion, the extract showed inhibition only in *Fusarium oxysporum* and URM5522 fungi, with inhibition halos corresponding to 2.5 cm.

Keywords: Actinobacteria, antifungal, extract of biomass.

1 INTRODUÇÃO

Os antioxidantes são substâncias que são capazes de inibir ou atrasar as taxas de oxidação. Atualmente são divididos em dois tipos, os enzimáticos (composto pelas enzimas produzidas no organismo) e os não enzimáticos, fazendo parte do segundo grupo as substâncias que geralmente pertencem ao metabolismo secundário, a exemplo temos os flavonóides, licopenos e bilirrubina. Essas substâncias podem agir diretamente, neutralizando a ação dos radicais livres e espécies não-radicaais, ou indiretamente, participando dos sistemas enzimáticos com tal capacidade (MOSCA et al., 2017). Assim, os antioxidantes são capazes de neutralizar um radical livre, devido a capacidade de doar o elétron que eles precisam. Neste contexto, os compostos antioxidantes vêm sendo amplamente utilizados no tratamento e prevenção de diferentes doenças e também podem ser empregados em diversas áreas como na indústria de alimentos, cosméticos, ou até mesmo na indústria farmacêutica (DOMÍNGUEZ et al., 2018; FALOWO et al., 2016). Desse modo, a prospecção de novos compostos com essa atividade é um campo de crescente pesquisas, tendo em vista a ampla demanda. Microrganismos, por sua vez, torna-se evidentes devido a capacidade de produção de várias moléculas de interesse biotecnológico, como exemplo, as substâncias com atividade antioxidante.

Dentre os microrganismos bastantes estudados quanto à produção de metabólitos secundários bioativos está o filo Actinobacteria destacando-se dentro desse filo a espécie

Brazilian Journal of Development

2.4 ANÁLISE QUALITATIVA DE DETECÇÃO DE FLAVONÓIDES E ALCALÓIDES

Análise preliminar da presença de flavonoides e alcaloides presentes no extrato acetato de etila da biomassa de *S. hygrosopicus* foi realizada através de reações químicas que resultam no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado, característico para cada classe de substâncias.

Para análise da presença de flavonoides utilizou a metodologia de Silva e seus colaboradores (2013). Para isso, foram pesados 10,36 mg do extrato oleoso em um béquer adicionados o extrato e 5mL de metanol, além disso, foram inseridos no meio 1 mL de HCl e 1 cm de fita de magnésio totalizando 43 mg, sendo assim esperando 15 minutos até o surgimento de coloração rosada como indicativo da presença de flavonóides.

Para detectar a presença de alcalóides foi baseado no teste de revelador Dragendoff (WAGNER, 1996). Foi pesado 1g de extrato em um tubo de ensaio, neste mesmo tubo foi adicionado 10 mL de H₂SO₄ 1%, consecutivamente a mistura foi aquecida em banho-maria a 100° C durante 2 minutos e filtrada logo após. Alíquota do filtrado foi colocada em outro tubo de ensaio e em seguida foi gotejado o reagente de Dragendorff.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EXTRAÇÃO EM ACETATO DE ETILA

O processo de otimização da obtenção do extrato, realizado por Borba (2016) promoveu uma ótima extração do extrato, tendo um rendimento de 2,6 a partir de 3 L. Além disso, o solvente acetato de etila por possuir características de ser um solvente apolar fraco, ele pode ter característica de extração de metabólitos secundários polares e apolares que possuem características polares quanto apolares, mostrando um solvente ideal para esse tipo de processo (TIAN *et al.*, 2013).

Em trabalhos anteriores que analisaram a otimização de obtenção de *Streptomyces* como o Ahmed e colaboradores em 2016, mostrou ser um dos melhores solventes para esse tipo de método. Ademais de suas propriedades positivas de carácter extrator, há outras vertentes a ser considera positivos para a escolha do acetato de etila como solvente como o caso de questões de técnica, duração da extração, questões ambientais e de segurança além a questão de custos.

3.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Na literatura existem uma variedade de testes *in vitro* para avaliar a atividade antioxidante, no presente trabalho utilizou-se de duas metodologias distintas. Avaliou a capacidade do extrato acetato de etila em reduzir captura dos radicais de ABTS (2,2azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico)), a concentração de 1,485 mg/mL do extrato apresentou uma inibição do radical ABTS

Brazilian Journal of Development

2 METODOLOGIA

2.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA

A actinobactéria *S. hygrosopicus* utilizada neste estudo está depositada na Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco sob o número de identificação UFPEDA3370. A fermentação destinada a produção dos metabólitos secundários foi realizada em condições otimizadas por trabalhos previamente descritos por Borba (2016). Para o processo a *S. hygrosopicus* foi semeada em placas de petri contendo meio de cultura ISP2 ágar e mantida em estufa por 7 dias à 37°C, em seguida 30 discos (9 mm) foram inoculados em meio líquido ISP2 para obtenção do pré-inóculo da fermentação. A fermentação para obtenção do extrato foi realizada em biorreator *New Brunswick Scientific* BIOFLO 110 (capacidade de 7L) utilizando 3-4L de meio líquido MPE, onde o 300 mL de pré-inóculo foi adicionado, tendo o objetivo o crescimento da actinobactéria e produção do metabólito secundário bioativo. O biorreator possui controle de temperatura, está mantida a 37°C e agitação mecânica de 200 rpm. O arrefecimento foi realizado pela injeção de ar comprimido, controlado no parâmetro: nível de O₂ (1/1) (v/v). O pH inicial foi em torno de 7,2. Após as 96 h de incubação o produto da fermentação em meio MPE foi centrifugado a 10000 rpm por 7 min, com a finalidade de separar a biomassa do sobrenadante. Então na biomassa foi inicialmente hexano 1:1 biomassa/solvente e posteriormente adicionado acetato de etila na proporção de 1:1 biomassa/solvente mantidos sob agitação 150 rpm durante 30 min. A mistura foi posteriormente filtrada a vácuo e posteriormente o solvente orgânico presente no sobrenadante foi evaporado no rotaevaporador a uma velocidade de 60 rpm, a uma temperatura de 40°C e submetidos às avaliações seguintes.

2.2 TESTES DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE: MÉTODO ABTS E DPPH

Para obtenção da atividade antioxidante do extrato acetato de etila obtido da biomassa de *S. hygrosopicus*, foi utilizado o método do radical livre ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazoline-6-ácido sulfônico). O radical ABTS+• foi preparado a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS 7 mM com 88 µL da solução de persulfato de potássio 140 mM. Mantido a mistura no escuro, à temperatura ambiente, por 16 horas. Em seguida, diluiu-se 1 mL desta mistura em álcool etílico PA (Vetec) até obter uma absorbância de 0,70 nm ± 0,05 nm a 734 nm, a qual foi preparada e usada no dia da análise. 30 µL do extrato foi adicionado a 3,0 mL da solução de ABTS+•. Após 6 minutos, foi realizada a leitura em 734 nm. A porcentagem de sequestro do radical ABTS+• foi calculada.

Brazilian Journal of Development

Para o método DPPH, utilizou a metodologia empregado Blois (1958). A partir do extrato oleoso obtido no biorreator, foi retirado 69 mg e homogeneizado com auxílio de um vortex com 900µL de etanol e 100µL de DMSO. Dessa solução, separou 500 µL sendo realizada uma diluição seriada nas concentrações de 10mg/mL a 0,312mg/mL. Após esse processo, 40 µL de cada amostra diluída foi adicionada em placas de 96 poços, iniciado em ordem decrescente de diluição. Sendo adicionado 200µL de um radical livre estável orgânico com a nomenclatura de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) a 0,02mM em cada poço com as amostras diluídas e incubado no escuro por 30 minutos. Após esse tempo as amostras foram lidas no leitor de microplaca à 517 nm. Para analisar a capacidade que a amostra teve de sequestrar o radical DPPH, utilizou a seguinte equação:

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = \frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}} \times 100}{A_{\text{controle}}}$$

Na qual A controle é a absorbância da solução do DPPH sem a amostra e A amostra é amostra com o DPPH.

2.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

A avaliação da atividade antifúngica inicialmente realizada frente aos fungos *Cladosporium tenuissimum* (URM5632), *Fusarium oxysporum* (URM7083), *Fusarium sonali* (URM320), *Mycrophonina pascolina* (URM2703) e *Colletotricum gloesporioides* (URM5522). Todos foram gentilmente cedidos da Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA).

Os fungos foram cultivados em Ágar dextrose batata. Soluções foram feitas previamente adicionando NaCl à 0,9% utilizando tween como diluente em água destilada. Após preparada, essa solução à cultura previamente estabelecida e com uma ajuda de uma alça foi possível desprender os esporos da placa obtendo assim uma solução salina de esporos. Após esse processo, 200µL dessa solução foram inseridos com auxílio de uma pipeta no meio de cultura Ágar dextrose batata e semeados com uma alça de trigaslki com o propósito de espalhar o fungo de forma homogênea. Assim, foram feitos quatro poços de 9 mm de diâmetro nas placas de ágar semeadas com o respectivo organismo teste na qual 100 µL do extrato acetato de etila obtido da biomassa de *S. hygroscopicus* foi inoculado em três poços e por fim água destilada foi inoculado no quarto poço servindo como controle negativo. A inibição do crescimento foi examinada após 24 h de incubação a 37 °C. A atividade antifúngica foi estimada pela medida do diâmetro da zona inibitória.

Brazilian Journal of Development

Streptomyces spp. (HWANG et al., 2014; TAN, et al., 2015). Esses microrganismos estão presentes em uma ampla variedade de ambientes naturais como solo, atmosfera, rios, lagos, ambientes marinhos e em habitats com características ecológicas específicas como depósitos de lixo, água residuárias, regiões vulcânicas, lagos salinos, fontes termais, entre outros (RAO et al., 2013). Grande parte desses metabólitos bioativos, são metabólitos secundários tendo base na sua biossíntese na formação os quais se originam dos metabólitos simples do metabolismo anfibólico (BILYK; LUZHETSKYY, 2016). Desse modo, uma vez secretados tem como objetivo de inibir a proliferação de outros organismos, no meio pobre, aumentando a chance de germinação de seus esporos e consequentemente sua sobrevivência (MADIGAN et al, 2004). Dentro do filo de bactérias a espécie *Streptomyces hygroscopicus* ganha destaque devido ser uma espécie com poucos estudos.

Os fungos fitopatogênicos, por sua vez, são organismos tem sua ação em plantações reduzindo suas taxas de germinação e sobrevivência, além de contribuir para perdas nutricionais da semente, gerando doenças em humanos e animais causando grandes impactos econômicos mundiais (SANTOS et al., 2011). Assim, grande tendência atual está no fato do desenvolvimento de compostos de origem orgânica frente a compostos sintéticos (BARROS et al. 2013). Dentro dessa categoria insere a substituição de produtos químicos sintéticos, pois esse gera uma serie de escala afetada, desde a saúde do produtor rural até todo ecossistema sendo grande parte desses produtos tóxicos são destinados ao controle de fungos fitopatogênicos. Dessa forma, devido a pressões bióticas, bactérias podem produzir diversos compostos antifúngico, sendo essa prospecção viável e altamente satisfatória como uma alternativa natural frente esses fitopatógenos (FUGA et al., 2011; JESUS; GUIMARÃES, 2018).

A Caatinga é um bioma brasileiro que possui uma área com cerca de 844.453 quilômetros quadrados, e seu ecossistema é restrito ao Brasil, o que implica a dizer que nenhuma outra região do mundo possui tal patrimônio biológico (BRASIL, 2018). Entretanto, apesar de ser rica em biodiversidade, há poucos estudos que buscam a prospecção de biomoléculas nessa região que possuem propriedades de interesse como o caso de moléculas com capacidade antioxidante principalmente aquelas produzidas por microrganismos (MELO et al., 2015). Dessa forma o presente trabalho teve por objetivo analisar a presença da atividade antioxidante do extrato em acetato de etila oriundo do microrganismo *Streptomyces hygroscopicus* isolado da Caatinga, além de estudar os efeitos desse extrato contra fungos fitopatogênicas afirmado, assim, sua propriedade antifúngica.

Brazilian Journal of Development

KISHIMOTO, S.; SATO, M.; TSUNEMATSU, Y.; WATANABE, K. Evaluation of 1 Biosynthetic Pathway and Engineered Biosynthesis of Alkaloids. *Molecules*. v. 21. n.8. p. 2 1078. Ago, 2016.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Brock: *Biologia de los 9 microorganismos*. 10 ed. Pearson: Prentice Hall. p. 1011. Jan, 2004.

MANIVASAGAN, P.; VENKATESAN, J.; SIVAKUMAR, K. K. S. Production, 11 Characterization and Antioxidant Potential of Protease from *Streptomyces* sp. MAB18 Using 12 Poultry Wastes. *BioMed Research International*, p.1-13. 2013.

MELO, I. S. et al. Biodiversidade e bioprospecção de microorganismos da caatinga. *EMBRAPA Meio Ambiente*. Mar, 2015.

MOSCA, S. S.; SANCHES, R. A.; COMUNE, A. C. A Importância dos antioxidantes na 22 neutralização dos radicais livres: uma revisão. *Revista Saúde em Foco*, 9ª ed, 2017.

RAO, K.V.R.; RAO, T. R. Molecular characterization and its antioxidant activity of a newly 1 isolated *Streptomyces coelicoflavus* BC 01 from mangrove soil. *Journal of Young 2 Pharmacists*. v.5, n.4, p.121-126, 2013.

SANTOS, A. F.; PARISI, J. J. D.; MENTEN, J. O. M. *Patologia de sementes florestais: 10 Importância da sanidade das sementes florestais: Embrapa florestas, Belém, p.236, 2011.*

SER, H. L.; TAN, L. T. H.; LAW, J. W. F.; CHAN, K. G.; DUANGJAI, A. Focused Review: 12 Cytotoxic and Antioxidant Potentials of Mangrove-Derived *Streptomyces*. *Frontiers in 13 Microbiology*, v.8, 2017.

SILVA, et al. Caracterização físico-química e análises por espectrofotometria e cromatografia 15 de *Peperomia pellucida* L. (H. B. K.). *Rev. Bras. Pl. Med*, v.15, n.4, p.717-726. Set, 2013.

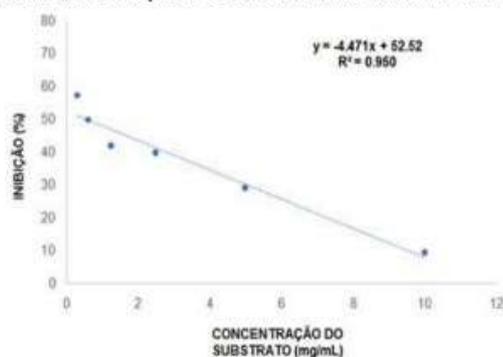
TAN, L. T. et al. Investigation of Antioxidative and Anticancer Potentials of *Streptomyces* sp. MUM256 Isolated from Malaysia Mangrove Soil. *Front. Microbiol*, v.6, p.1316. Nov, 2015

TIAN, Y.; XU, Z.; ZHENG, B.; LO, Y. M. 2013. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punicagranatum* L.) seed oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 202–208.

Brazilian Journal of Development

de 29,15%. Ao realizar a atividade antioxidante do extrato através do método de DPPH, obtivemos os seguintes valores de IC_{50} de $0,565 \pm 0,028$ mg/mL. estes dados estão apresentados na Figura 1.

Figura 1. Percentual de inibição de DPPH do extrato acetato de etila de *S. hygroscopicus*.



Fonte: Autor (2018)

A atividade antioxidante de metabólitos secundários produzidos pelo gênero *Streptomyces* pode apresentar grandes variações. Manivasagan e colaboradores (2013), demonstraram que uma protease produzida por *Streptomyces* sp. obteve IC_{50} de $78 \pm 0,28$ mg/mL. Ser e seus colaboradores (2013), em um estudo sobre atividade antioxidante de uma nova espécie de *Streptomyces* sp. mostrou que extrato metabólicos em concentração de 2 mg/mL apresentaram porcentagem de inibição de $27,24 \pm 1,91\%$. Esse resultado é algo interessante pois, em um ambiente que exista estresses como estresses oxidativos os organismos bem mais adaptados são aqueles que irão possuir atividade antioxidante gerando assim uma vantagem seletiva.

3.3 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

A atividade antioxidante de metabólitos secundários produzidos pelo gênero *Streptomyces* pode apresentar grandes variações. Manivasagan e colaboradores (2013), demonstraram que uma protease produzida por *Streptomyces* sp. obteve IC_{50} de $78 \pm 0,28$ mg/mL. Ser e seus colaboradores (2013), em um estudo sobre atividade antioxidante de uma nova espécie de *Streptomyces* sp. mostrou que extrato metabólicos em concentração de 2 mg/mL apresentaram porcentagem de inibição de $27,24 \pm 1,91\%$. Esse resultado é algo interessante pois, em um ambiente que exista estresses como estresses oxidativos os organismos bem mais adaptados são aqueles que irão possuir atividade antioxidante gerando assim uma vantagem seletiva.

Brazilian Journal of Development

Figura 2. Halo de inibição de *Fusarium oxysporum* com o extrato de *S. Hygroscopicus*.



Fonte: Própria (2019)

Diferentes classes de compostos químicos do metabolismo secundário são encontradas em extratos provindos de culturas de *Streptomyces* sp. como demonstrado por Jaivel e colaboradores (2014), ao realizar o teste qualitativo para flavonóides e alcalóides no extrato acetato de etila de *S. hygroscopicus*, os resultados foram positivos para o teste de alcalóides e negativo para flavonoides. Sabe-se que as variedades de alcalóides são produzidas por vários organismos, incluindo bactérias, fungos e plantas, como metabólitos secundários que exibem bioatividades úteis. Os alcalóides foram originalmente definidas como compostos orgânicos de origem vegetal que possuem bioatividades fortes e exibem basicidade que é atribuído a presença de nitrogênio (KISHIMOTO et al., 2016).

4 CONCLUSÕES

O extrato acetato de etila obtido da biomassa de *Streptomyces hygroscopicus*, apresentou atividade antioxidante capaz de reduzir os radicais 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazoline-6-ácido sulfônico e 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), apresentando atividade antimicrobiana capaz de inibir os fungos fitopatogênico *Fusarium oxysporum* e URM5522 o extrato bioativo em teste qualitativo mostrou-se positivo para a classe de metabólitos secundários de alcalóides. Constituindo um extrato bastante promissor para trabalhos futuros de purificação e identificação dos compostos bioativos, caracterizando-o como um extrato potencialmente aplicável na indústria biotecnológica.

REFERÊNCIAS

- AHMED, I. K.; HANAN, E. B.; HUMODI, A. S. Streptomyces species from red sea habitat: isolation, characterization and screening for antibacterial compounds. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*. v.6, n.1, p.62-71, 2016.
- AMINI, J.; AGAPOOR, Z.; ASHENGROPH, M. Evaluation of Streptomyces spp. against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for the management of chickpea wilt. *Journal of Plant Protection Research*, v.56, n.3, 2016.
- BARROS, L. S.; ADORIAM, A. I.; KOBAYASTI, L. Uso de extratos vegetais na inibição do crescimento micelial in vitro de *Acremonium* sp. e *Fusarium verticillioides*. *Revista Enciclopédia Biosfera, Goiânia*, v.9, n.16, p.2072-2076. 2013.
- BILYK, O.; LUZHETSKYY, A. Metabolic engineering of natural product biosynthesis in 22 actinobacteria. *Curr Opin Biotechnol*. v.42, n.1, p.98-107, 2016.
- BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the use of a Stable Free Radical. *Nature*, v.181, 28 n. 4617, p.1199-1200, 1958.
- BORBA, C. B. A. Avaliação de metabólito Secundário de *Streptomyces* sp., sua atividade 24 antimicrobiana e citotoxicidade; identificação morfológica e molecular da actinobactéria. 25 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Programa de Pós-Graduação em 26 Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, PE. 2016.
- BRASIL, MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. *Biomass: Caatinga*. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomass/caatinga>. Acessado em: 15 out, 2018.
- DOMÍNGUEZ, R. et al. Active packaging films with natural antioxidants to be used in meat industry: A review. *Food Research International*. v. 113. p. 93-101. Nov, 2018.
- FALOWO, A. B.; FAYEMI, P.O; MUCHENJE. Natural antioxidants against lipid-protein 13 oxidative deterioration in meat and meat products: A review. *Food Res. Int*, v.64, p.171-181, 14 2014.
- FUGA, C. A. G.; GONÇALVES, D. C.; CUNHA, W. V. Inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Bacillus* spp. "in vitro". *Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão. Patos de Minas*, v.1, n. 8, p.188194, 2011.
- HWANG, K. S. et al. Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the 31 production of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, v. 32, p. 255–268, 2014.
- JAIVEL, N.; UVARANI, C.; RAJESH, R.; VELMURUGAN, D.; MARIMUTHU, P. Natural 33 occurrence of organofluorine and other constituents from *Streptomyces* sp. TC1. *J Nat Prod*. 34 v. 77, n. 1, p. 2-8. Jan, 2014.
- JESUS, M. S.; GUIMARÃES, P. G. Utilização de bactérias no controle de fungos fitopatogênicos in vitro. *Ver Ourucur*. v.8, n.1, 2018

9.1.2 Capítulos de livros

Saúde a Serviço da Vida, 2020, 796 fls

Capítulo 18 – Páginas 370 - 387

ISBN: 978-85-53005-36-9 (on-line)

Organizadores: Giselle Medeiros da Costa One, Maria Luiza Souto Porto. IMEA

Instituto Medeiros de Educação Avançada – IMEA – João Pessoa - PB

Disponível em: <<http://www.cinasama.com.br>>

WHEY PROTEIN : AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTES

CAPÍTULO 18

WHEY PROTEIN : AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTES

Mariane Prieto Lima da Silva ¹

Maria Luiza Sousa Silva ²

Luana Maria Cavalcanti Teixeira³

Leonor Alves de Oliveira da Silva ⁴

¹ Graduanda do curso de Educação Física, UFPB; ² Graduanda do curso de Biomedicina, UFPB, ³ Doutoranda PPG-Bioquímica, UFPE; ⁴ Orientadora/Professora do DBM/UFPB.

marianeprieto@hotmail.com

RESUMO: O Whey Protein tem sido uma substância recomendada para melhorar a saúde, onde com sua ingestão tornando-se um complemento nutricional com uma ampla quantidade de antioxidante e os nutrientes antioxidantes sendo de grande importância na prevenção de doenças e aumento da imunidade. Neste contexto o trabalho tem como objetivo avaliar amostras diferentes de suplementos alimentares do tipo Whey Protein, quanto a atividade antioxidante e quantidade de proteínas totais solúveis. As amostras foram compostas por quatro Whey Protein diferentes designados A,B,C e D, todos foram submetidos extração com etanol PA por 24h a 30°C e sonicação e posteriormente filtradas e rota-evaporadas a 40°C e por fim utilizadas na determinação de proteínas totais e atividade antioxidante. A atividade antioxidante foi determinada por três métodos: do ABTS; DPPH e MO⁶⁺. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados de capacidade antioxidante foram expressos em % de inibição dos respectivos radicais livres. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados obtidos permitem inferir que existem no mercado diferentes tipos de suplementos alimentares com teores proteicos bastante diversificados e com diferentes atividades antioxidantes e que alguns Whey protein presentes no mercado apresentam um teor considerado de antioxidante podendo ser

WHEY PROTEIN : AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTES

um suplemento alimentar podem ser de grande importância na prevenção de doenças e propiciando um aumento da imunidade.

Palavras-chave: Suplemento alimentar. DPPH. ABTS.

INTRODUÇÃO

Os antioxidantes são substâncias capazes de neutralizar um radical livre, doando o elétron que eles precisam. Os radicais livres, são átomos ou moléculas que contém um ou mais elétrons não pareados, por este motivo os radicais livres atacam as outras moléculas, roubando ou cedendo elétrons para se tornarem estáveis, podendo reduzir os seus elétrons (oxidar). Os radicais livres são liberados durante o metabolismo humano, e também são produzidos por poluentes ambientais (atmosférico, aquático, solo), radiação (ultravioleta, gama, hertziana), entre outros. Podem estar relacionados ao consumo ou uso de toxinas como álcool, tabaco e drogas ou devido a nutrição inadequada, exposição a fertilizantes ou pesticidas. Também inclui o metabolismo de alguns produtos químicos e alto estresse físico ou psíquico (MOSCAL et al., 2017). Os radicais livres são moléculas tóxicas altamente reativas e de vida curta possuem um ou mais elétrons não pareados e podem causar danos no DNA, proteínas, lipídeos e carboidratos, levando a muitas doenças. Os antioxidantes são substâncias que evitam a ação deletéria destes radicais livres sobre as células sendo compostos capazes de inibir ou retardar o processo de oxidação no organismo, combatendo o envelhecimento precoce e prevenindo doenças (MOKRANI & MADONI, 2016). Vários antioxidantes sintéticos , como a mistura de 2 isômeros, o 2 e o 3-terc-butil-4-hidroxianisol (BHA) e o hidroxitolueno butilado (BHT), foram extensivamente

WHEY PROTEIN : AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTES

adicionados aos alimentos, embora seu uso seja questionado devido sua toxicidade; portanto há um interesse considerável em medidas preventivas, com utilização de alimentos com antioxidantes naturais. Sabendo-se que os seres vivos o tempo todo são "combatidos" pelos antioxidantes, os quais podem ser produzidos pelos organismos vivos ou obtidos através de alimentos consumidos. Os antioxidantes podem ser encontrados nos alimentos naturais, nos suplementos de vitaminas e minerais.

Dependendo do local de atuação de um antioxidante e do mecanismo de inibição frente aos radicais livres os mesmos podem ser classificados em primários, sinergistas, removedores de hidrogênio, agentes biológicos, quelantes e mistos. Antioxidantes multifuncionais são antioxidantes que podem apresentar propriedades antioxidantes primárias e secundárias (RAWAT et al., 2015).

Outra classificação importante para os compostos designados antioxidantes, podendo ser os Enzimáticos que são enzimas produzidas pelo próprio organismo, e são as primeiras a agirem, para evitar o acúmulo do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio. E as não-enzimáticas que são antioxidantes obtidos a partir da nossa dieta.

Neste contexto a utilização de alimentos com atividade antioxidantes vem se destacando e a indústria alimentícia comercializa muitos alimentos ricos em proteínas com altos níveis de antioxidantes tornando-se uma fonte de estudo de grande importância, pois estes alimentos estão sendo muito consumidos visando um grande benefício na melhoria da qualidade de vida.

O corpo humano possui um sistema complexo de defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas naturais que neutralizam os efeitos nocivos dos radicais livres e outros

WHEY PROTEIN : AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTES

oxidantes, atuando sobre os radicais livres, são responsáveis por causar um grande número de doenças, incluindo câncer, doença cardiovascular, distúrbios neurais, doença de Alzheimer, transtorno cognitivo leve, doença de Parkinson, doença hepática induzida por álcool, colite ulcerativa, envelhecimento, aterosclerose e fadiga muscular, esta proteção contra os radicais livres pode ser aumentada pela ingestão ampla de antioxidantes, indicando que alimentos contendo antioxidantes e possivelmente, em particular, os nutrientes antioxidantes, podem ser de grande importância na prevenção de doenças, aumento da imunidade (ALAM et al. 2013; COOPER, E. L. & MA, M. J., 2017).

Segundo Macedo et al. (2019) a prática regular de atividade física gera benefícios ao corpo. Contudo, quando os limites fisiológicos não são respeitados, podem provocar danos ao organismo, como por exemplo, o aumento da produção de radicais livres, que se não forem devidamente neutralizados, podem danificar as células sadias e tecidos do organismo, sendo necessário a ativação de compostos com atividade antioxidante no organismo. Tendo em vista a importância do exercício físico e seus benefícios a saúde, bem como o consumo de antioxidantes, é necessário a realização de estudos com enfoque na temática abordada, no intuito de conscientizar os praticantes de atividade física, sobre os efeitos positivos que a ingestão desses compostos podem trazer ao seu organismo e como efeito protetor contra diversos tipos de patologias.

Diferentes estudos estão sendo realizados a fim de avaliar o efeito da suplementação alimentar, utilizando compostos com atividade antioxidante com fim de melhora da performance e resistência da prática de exercícios físicos (JEUKENDRUP, 2017; SOARES T.C. et al., 2019). É

WHEY PROTEIN : AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTES

imprescindível que o praticante de atividade física tenha suas necessidades nutricionais atendidas, visto que há uma relação direta entre alimentação, desempenho e eficiência, neste contexto existe no mercado uma grande variedade de suplementos alimentares sendo bastante comum e frequente o uso de suplementos proteicos energéticos, sendo o Whey Protein muito utilizado.

Whey protein é um suplementos proteicos formulados a partir das proteínas do soro do leite, apresentam alto valor nutricional (SILVA, L.V. ; SOUZA, S.V.C., 2016).

A ANVISA estabelece os requisitos que esses alimentos devem atender, os quais incluem: i) o produto pronto para consumo deve conter, no mínimo, 10 g de proteína na porção; ii) o produto pronto para consumo deve conter, no mínimo, 50 % do valor energético total proveniente das proteínas; iii) este produto pode ser adicionado de vitaminas e minerais, conforme Regulamento Técnico específico sobre adição de nutrientes essenciais; iv) este produto não pode ser adicionado de fibras alimentares e de não nutrientes. Além disso, a composição proteica do produto deve apresentar escore aminoacídico corrigido pela digestibilidade da proteína (PDCAAS - Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score) acima de 0,9 e o conteúdo nutricional não pode variar mais que 20 % em relação às quantidades declaradas no rótulo (BRASIL, 2010).

Neste contexto o presente trabalho tem como objetivo avaliar quatro amostras diferentes de suplementos alimentares do tipo Whey Protein, quanto a atividade antioxidante e quantidade de proteínas totais solúveis.

MATERIAIS E MÉTODO

Preparo das amostras extrato

Quatro amostras distintas de whey protein (A,B,C e D) foram submetidos a extração com solvente orgânico etanol (PA) segundo metodologia adaptada de Shanmugam et al. (2019), na qual em três gramas de cada amostra foi adicionado 12 mL de etanol, incubada por 24h a 25 °C, posteriormente submetida por 1 minuto em um sonicador (50%). Após essa etapa as amostras foram filtradas, rota-evaporadas a 40°C e utilizadas na determinação de proteínas totais e atividades antioxidante.

Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante (AA) in vitro dos extratos etanólicos foram determinadas por três métodos: utilizando do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS); 2,2'-difetil-1-picri-hidrazilo (DPPH), e MO^{6+} . Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados de capacidade antioxidante foram expressos em % de inibição dos respectivos radicais livres.

A atividade antioxidante pelo método ABTS foi determinada de acordo Sánchez-González et al. (2005), na qual a atividade antioxidante é medida através da captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS.+), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. Esse radical (de cor verde escura) pode reagir de forma enérgica com compostos doadores de hidrogênio, como compostos fenólicos, sendo convertido em uma forma não colorida ou de menor intensidade.

WHEY PROTEIN : AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTES

Para a preparação do radical ABTS⁺, foram adicionados, em um frasco âmbar, 5 mL de solução aquosa de ABTS [ácido 2,2 azino-bis (3-etilbenzotiazolina-ácido 6-sulfônico) 7 mM e 88 µL da solução de persulfato de potássio 140 mM. O frasco foi deixado em repouso, no escuro, por aproximadamente 16 h, para estabilização da solução. A solução de ABTS⁺ foi diluída em álcool etílico até atingir uma absorbância de $0,700 \pm 0,020$ a 734 nm. As amostras sofreram reação com a solução do radical ABTS⁺ (proporção 1:10) durante 6 min e as absorbâncias foram lidas a 734 nm (Biospectro, modelo SP-220). Foi construída uma curva padrão de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,3,7,8-tetrametilcromo 2-carboxílico), com uma massa variando de 0,30 µg a 3,32 µg, em álcool etílico.

O teste de DPPH é um dos métodos indiretos para se determinar a atividade antioxidante mais antigo sendo sugerido originalmente em 1950 para se descobrir os doadores de hidrogênio em matérias naturais. Mais tarde foi quantificado para determinar o potencial antioxidante de compostos fenólicos isolados e alimentos tão bem como amostras biologicamente relevantes. Esse método consiste em avaliar a capacidade antioxidante via atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila – DPPH. O radical DPPH possui coloração púrpura absorvendo a um comprimento de onda máximo de aproximadamente 516 nm. Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R.), o DPPH. é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou porcentagem de DPPH. remanescente no meio reacional. O DPPH apresenta-se como um método

WHEY PROTEIN : AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTES

simples podendo também ser usado para avaliar a atividade antioxidante de formas sintéticas (ex: nimesulida, dapsona e ácido acetilsalicílico), algas, quitosanas, etc., (KIM; THOMAS, 2006).

Para o método DPPH, em 240 µL de cada amostra foi acrescentado 1500 µL de solução etanólica do radical livre DPPH 0,04 mg/mL, e incubada por 30 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Como controle foi utilizada uma alíquota de 1500 µl de solução metanólica de DPPH adicionada de 240 µl de etanol. As absorvâncias foram lidas a 517 nm (Biospectro, modelo SP-220). Foi construída uma curva padrão de ácido ascórbico com concentrações variando de 4,0 µg/mL a 25 µg/mL, em álcool etílico.

As atividades sequestrantes de radicais livres de DPPH e ABTS foram expressas em porcentagem de descoloração (% descoloração) pode ser expressa em porcentagem por comparação a um controle ou branco, segundo a seguinte equação:

$$\%ASRL = (\%Descoloração) = ((Ac-At)/Ac)*100$$

Onde

Ac: absorvância controle ou branco;

At: absorvância teste (amostra).

O método de avaliação de atividade antioxidante com formação do complexo fosfomolibdênio seguiu a metodologia descrita por Prieto (1999), na qual consistiu em adicionar 0,3 mL dos extratos (200 µg/mL), em 3 mL do reativo (molibdato de amônio 4 mM, fosfato de sódio 28 mM, ácido sulfúrico 0,6 M). Posteriormente incubou-se em banho-maria a 95 °C por 90 min. após resfriamento foi realizada uma leitura em

WHEY PROTEIN : AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTES
espectrofotômetro UV a 695 nm, utilizando como branco 0,3 mL água e 3 mL do reativo. A substância referência utilizada foi ácido gálico. A capacidade de redução do extrato foi expressa em mg de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato. A curva padrão foi construída utilizando ácido gálico de 1 a 50 µg.

Determinação de proteínas totais solúveis

O método foi executado conforme descrito por Lowry et al, utilizando-se as soluções de carbonato de sódio a 2% em hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹; sulfato de cobre 1%; tartarato de sódio e potássio 2%; solução contendo 2% de carbonato de sódio, 0,01% de sulfato de cobre e 0,02% de tartarato de potássio em hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ e o reagente de fenol FolinCiocalteau diluído na proporção de 1:1 (v/v) em água ultrapura. A curva de calibração foi preparada com solução de albumina nas concentrações de 0,15 a 2 mg/mL e efetuada as leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 660 nm. As dosagens foram realizadas em triplicatas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

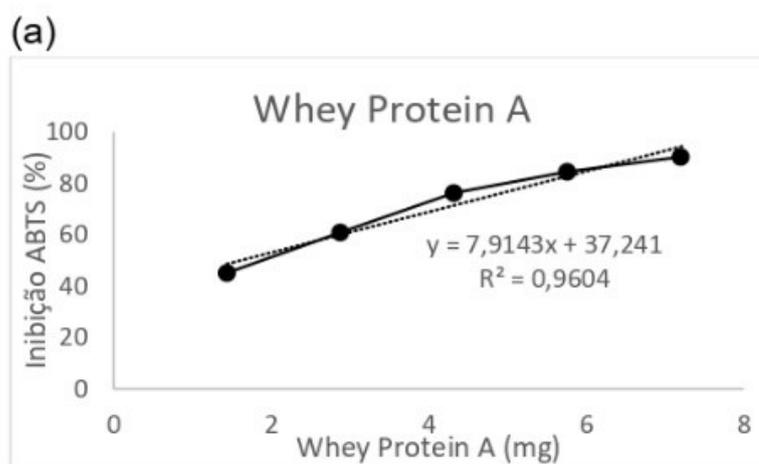
Sabendo-se que existe uma relação entre nutrição e atividade física muito acentuada que gera benefícios não apenas quanto à perda de peso devido à elevação do gasto energético, mas também propicia resultados positivos para o sistema metabólico e cardiovascular (MACEDO, J.L. et al, 2019). O whey Protein tem sido uma substância recomendada para melhorar a saúde, tornando-se um complemento nutricional muito consumido por diferentes grupos de pessoas que buscam um equilíbrio nutricional e uma vida mais saudável.

WHEY PROTEIN : AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTES

No presente trabalho foi analisado o poder antioxidantes de diferentes whey protein. Os teores de atividade antioxidante pelo método ABTS, obtida das quatro amostras distintas de whey protein (A,B,C e D) e a reta padrão para o trolox estão na Figura 1.

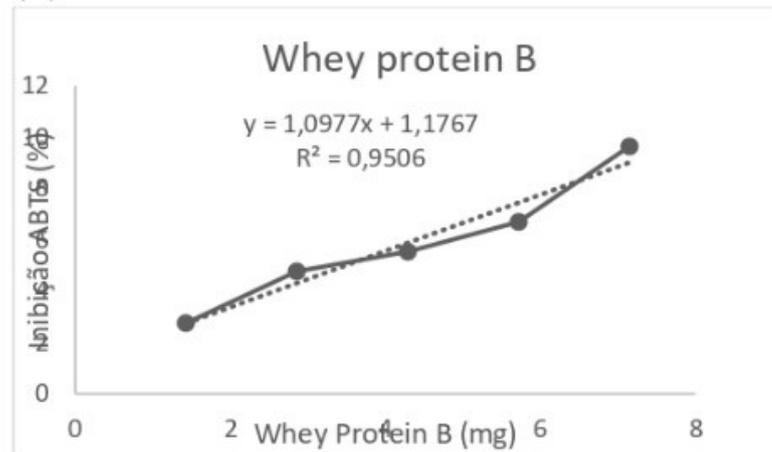
O valor de IC 50% pelo método ABTS foi definido como massa em mg de extrato requerida para decrescer a concentração inicial de ABTS em 50%, estes valores foram determinados nas quatro amostras estão apresentados na Tabela 1. Todas os quatro extrato etanólicos obtidos dos diferentes whey protein estudado neste trabalho apresentam capacidade de reduzir o radical ABTS onde o Whey protein A se destacou apresentando menor IC50% com valor de $1,088 \pm 0,002$ mg. Dryáková et al. 2010, trabalhando com a mesma metodologia detectou atividades antioxidantes em hidrolisados de whey protein obtendo um um valor de 0,1mg/mL.

Figura 1. Atividade antioxidante pelo método ABTS dos extratos etanólicos das amostras de whey Protein A (a), whey Protein B (b), whey Protein C (c), whey Protein D (d) e reta padrão de trolox (e).

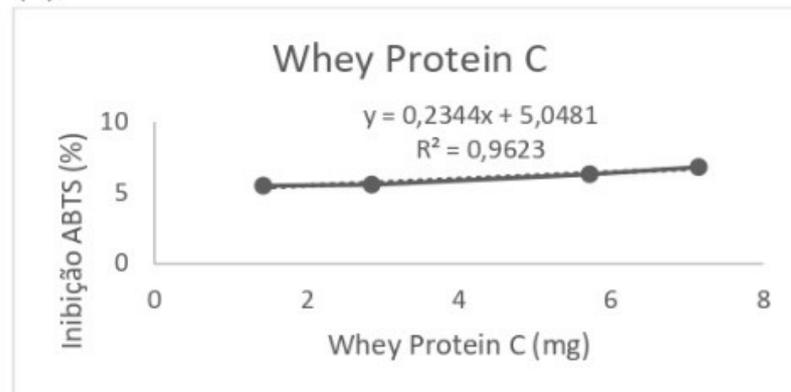


WHEY PROTEIN : AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTES

(b)

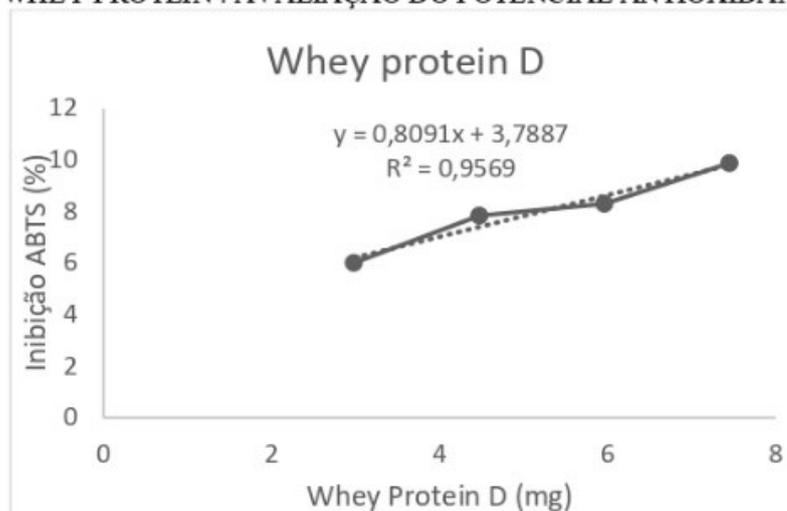


(c)

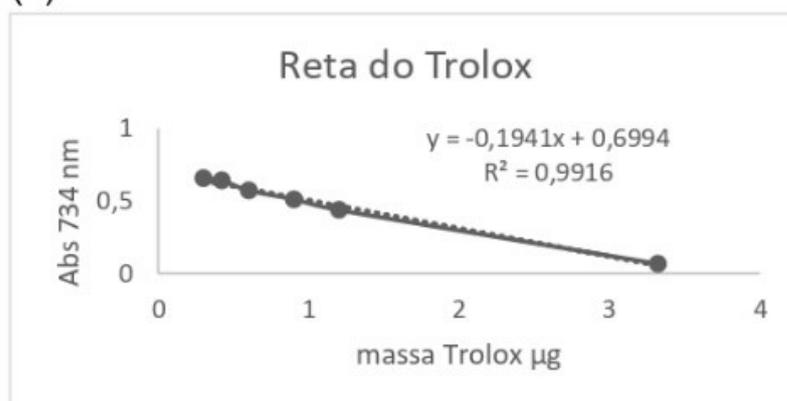


(d)

WHEY PROTEIN : AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTES



(e)



Fonte: (Dados da pesquisa)

Tabela 1- IC 50% pelo método ABTS dos extratos etanólicos de Whey Protein

Amostra	IC 50% (mg)
Whey Protein A	1,088 ± 0,002
Whey Protein B	45,106 ± 0,009
Whey Protein C	206,849 ± 0,011
Whey Protein D	57,114 ± 0,013

WHEY PROTEIN : AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTES

Fonte: (Dados da pesquisa)

Para avaliar a metodologia do DPPH construiu-se um gráfico relacionando o percentual de inibição do radical livre DPPH em função da concentração do padrão ácido ascórbico, Figura 2.

A capacidade de sequestro do radical DPPH dos quatro extratos etanólicos de Whey Protein foram calculados e os resultados estão apresentados na Tabela 2. Kerasioti et al., 2014 trabalhando com mesma metodologia estudou o efeitos antioxidantes da whey protein nas células c2C12 e detectou em valor de atividade antioxidante pelo método DPPH correspondente a 3,1 mg proteína/mL.

Figura 2- Capacidade de sequestro do radical DPPH versus concentrações do padrão de ácido ascórbico.



Fonte: (Dados da pesquisa)

Vários trabalhos citados na literatura utilizam as referidas técnicas para analisar atividade antioxidante em diferentes alimentos o presente trabalho corrobora com os dados obtidos na literatura, detectando que o suplemento alimentar Whey protein tem atividade antioxidante (Kerasiotl et al., 2016; Kraitsoul et al., 2019).

WHEY PROTEIN : AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTES

A utilização de whey protein como suplemento alimentar apresenta propriedades antioxidantes eficientes em níveis moleculares e teciduais, apresentando capacidade em neutralizar radicais livres como DPPH• , ABTS• bem como OH• e O₂• que normalmente existem no organismo (Niero et al., 2018).

Para avaliar a metodologia de fosfomolibdênio construiu-se um gráfico no qual a qual pode ser medida a capacidade antioxidante total utilizando o método de formação do complexo fosfomolibdênio com o padrão de ácido gálico conforme está presente na Figura 3.

O método de fosfomolibdênio, mede a capacidade antioxidante total, é considerado reprodutível, de baixo custo, livre da interferência de solventes e sem qualquer limitação, foi ajustado à determinação da capacidade antioxidante manifestada nos extratos etanólicos das amostras estudadas no presente trabalho e suas atividades antioxidantes estão apresentados na Tabela 2, a capacidade de redução do extrato foi expressa em mg de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato.

Para todos as amostras foram realizadas quantificações proteicas pelo método de Lowry, visando determinar a concentração proteica no extrato etanólico das diferentes mostras de Whey protein estudada que em condições alcalinas as substância presentes no reagente colorimétrico Folin Ciocalteau interagem com as proteínas da amostra gerando um complexo de cor azul que pode ser medido num espectrofotômetro no comprimento de onda de 750 nm. A técnica é bastante sensível, No experimento realizado, elaborou-se uma curva padrão com albumina de soro bovino (BSA) como solução padrão, onde obteve-se um fator de calibração médio para calcular a concentração de proteínas nas amostras e estes

WHEY PROTEIN : AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTES
valores foram de $3,875 \pm 0,019$ mg/mL (Whey Protein A), $2,419 \pm 0,084$ mg/mL (Whey Protein B), $1,348 \pm 0,006$ mg/mL (Whey Protein C) e $0,191 \pm 0,003$ mg/mL (Whey Protein D).

Tabela 2- Atividade antioxidante dos extratos etanólicos pelo método DPPH e método de fosfomolibdênio.

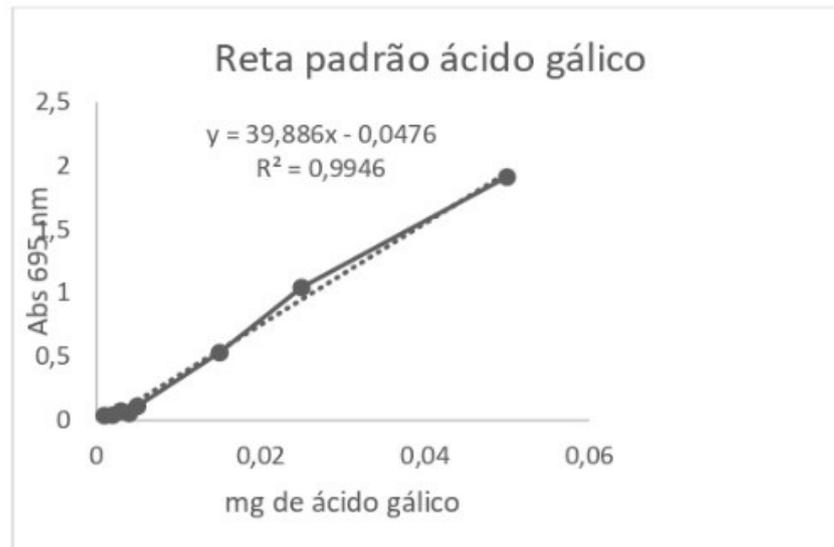
Amostra	Percentual de Inibição do DPPH (%)	Atividade antioxidante Fosfomolibdênio (mg de ác. gálico/g extrato)
Whey Protein A	$31,081 \pm 1,146$	$0,017 \pm 0,000$
Whey Protein B	$41,081 \pm 1,822$	$0,005 \pm 0,001$
Whey Protein C	$31,081 \pm 1,146$	-
Whey Protein D	$41,891 \pm 1,338$	-

Fonte: (Dados da pesquisa)

Tendo em vista a procura por uma alimentação de boa qualidade e muitas vezes associadas a suplementações que tragam benefícios a saúde. Bem como a utilização de compostos antioxidantes encontrados na dieta que aumentam os mecanismos de defesa contra os radicais livres. Neste contexto o whey é uma proteína derivada do soro do leite que é muito comum em suplementações que apresentam atividades antioxidantes. Neste enfoque é necessário a realização de mais estudos na temática abordada, no intuito de conscientizar os praticantes de atividade física e os consumidores de suplementos alimentares, sobre os efeitos positivos que a ingestão desses compostos podem trazer ao seu organismo e como efeito protetor contra diversos tipos de patologias.

WHEY PROTEIN : AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTES

Figura 3- Reta padrão de ácido gálico pelo método de fosfomolibdênio



Fonte: (Dados da pesquisa)

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas condições de realização desta pesquisa permitem inferir que: existem no mercado diferentes tipos de suplementos alimentares com teores proteicos bastante diversificados e com diferentes atividades antioxidantes, agregando valor nutricional e funcional de grande benefício na melhoria da qualidade de vida, entretanto existem poucos estudos relacionando a atividade antioxidante em suplementos alimentares ricos em proteínas, fazendo necessário dar continuidade ao tema avaliado.

WHEY PROTEIN : AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTES

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAM, M. N., BRISTID N.J., RAFIQUZZAMAN M., Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmaceutical Journal, V. 21, P.143-152, 2013.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 18, de 27 de abril de 2010**. Aprova o regulamento técnico sobre alimentos para atletas. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, Brasília, 27 abr. 2010.

COOPER, E. L.; MA, M. J. **Alzheimer Disease: Clues from traditional and complementary medicine**. Journal of Traditional and Complementary Medicine, 7, 380, 2017.

DRYÁKOVÁ, A; PIHLANTO, A.; MARNILA, P.; ČURDA, L.; KORHONEN, HJT. **Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods**. European Food Research and Technology, v. 230, 6,p. 865-874., 2010.

JEUKENDRUP AE. **Periodized nutrition for athletes**. Sports Medicine,; 47(1): 51-63, 2017. Food Chemistry, v. 155, 15 july, p. 271-278, 2014.

KERASIOTI, E.; STAGOS, D.; GEORGATZI, V.; BREGOU, E.; PRIFTIS, A.; KAFANTARIS, I.; KOURETAS, D. **Antioxidant Effects of Sheep Whey Protein on Endothelial Cells**. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 10 pages, 2016.

KIM MM, VAN TA Q, MENDIS E, RAJAPAKSE N, JUNG WK, BYUN HG. **Phlorotannins in Ecklonia cava extract inhibit matrix metalloproteinase activity**. Life Sci., 79(15):1436-43; 2006.

KREATSOULI, K.; FOUSTERI, Z.; ZAMPAKAS, K.; KERASIOTI, E.; VESKOUKIS, A.S; MANTAS, C.; GKOUTSIDIS, P.; LADAS, D.; PETROTOS, K.; KOURETAS, D.; STAGO, D. **A Polyphenolic Extract from Olive Mill Wastewaters Encapsulated in Whey Protein and Maltodextrin Exerts Antioxidant Activity in Endothelial Cells**. Antioxidants, 8, 280, 2019.

LOWRY, OH, NJ Rosbrough, AL Farr, and RJ Randall. **The Lowry method for protein quantification**. J. Biol. Chem. 193: 265. 1951

MACEDO, J. L.; SILVA, D.J.S.; SANTOS, L.S.; RAMOS, S.M.N.; OLIVEIRA, N.S.L.; ASSUNÇÃO, M.J.S.M. **Consumo de antioxidantes por praticantes de atividade física**. Revista Brasileira de Nutrição Esportiva, São Paulo. v. 13. n. 80. p.550-556, 2019.

MOKRANI A., MADANI K. **Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (Prunus persica L.) fruit**. Separation and Purification Technology, v. 162, p. 6876, 2016.

- WHEY PROTEIN : AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTES
 MOSCAL, S.S.; SANCHES, R.A.;COMUNE, A.C.C. **A IMPORTÂNCIA DOS ANTIOXIDANTES NA NEUTRALIZAÇÃO DOS RADICAIS LIVRES: uma revisão.** Revista Saúde em Foco – Edição nº 9 – Ano: 2017.
- NIERO, G.; CURRÒ, S.; COSTA, A.; PENASA, M.; CASSANDRO, M.; BOSELLI, C.; GIANGOLINI, G.; DE MARCHI, M. **Phenotypic characterization of total antioxidant activity of buffalo, goat, and sheep milk.** J. Dairy Sci. , 101, 4864–4868, 2018.
- PRIETO P, PINEDA M, AGUILAR M. **Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a fosphomolybdenum complex: specific aplication to the determenation of vitamin E.** Anal Biochem 269: 337-341, 1999.
- RAWAT D. S., JOSHI G., LAMBA B. Y., TIWARI A. K. KUMAR P. **The effect of binary antioxidant proportions on antioxidant synergy and oxidation stability of Jatropha and Karanja biodiesels.** Energy, v. 84, p. 643-655, 2015.
- SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, I. et al. **In vitro antioxidant activity of brewed using different procedures: Italian, espresso and filter.** Food Chemistry, Oxford, v. 90, n. 1/2, p. 133-139, Jan./ Feb. 2005
- SHANMUGAM S1 · SHANKAR K · RAMACHANDIRAN S., NAIDU K., KALIMUTHU K., MUTHUVE A. **In Vitro Studies and Characterization of Tissue Protein from Green Mussel, Perna viridis (Linnaeus, 1758) for Antioxidant and Antibacterial Potential.** International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 21, 2019.
- SILVA, L.V.; SOUZA, S.V.C. **Quality of protein supplements: evaluation of composition and labeling.** Rev Inst Adolfo Lutz, ;75:1703, 2016.
- SOARES T.C., VILARINHO M.F.S.B., SOARES T.C, ROCHA L.A., SANTANA L.C.B., SILVA L.A.A., FARIAS R.K.C., SILVA N.C., SOUSA M.M.C., SILVA K.H.R., CÂMARA G.B., LIMA V.M., BARROS I.S., ROCHA G.C., OLIVEIRA V.A. **Efeitos da suplementação das vitaminas C e E na prática de atividade física: uma revisão sistemática.** Revista Eletrônica Acervo Saúde / Electronic Journal Collection Health, Vol. 11 (7), p.1-12, 2019.

Biotecnologia: tecnologia a serviço da saúde, 2020, 726 fls.

Capítulo 4 – Páginas 74 - 89

ISBN: 978-85-53005-27-7 (on-line)

Organizador: Giselle Medeiros da Costa One

Instituto Medeiros de Educação Avançada – IMEA – João Pessoa - PB

Disponível em: <<http://www.cinasama.com.br>>

AValiação DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO *SARGASSUM sp*

CAPÍTULO 4

AValiação DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO *SARGASSUM sp*

Maria Luiza de Sousa Silva ¹

Mariane Prieto Lima da Silva ²

Luana Maria C. Teixeira ³

Leonor Alves de Oliveira da Silva ⁴

¹Graduanda do curso de Biomedicina, ² Graduanda do curso de Educação Física, UFPB³,
Doutoranda PPG-Bioquímica e Fisiologia, UFPE; ⁴ Orientadora/Professora do DBM/UFPB.
smariasluiza2017@gmail.com

RESUMO: A busca por compostos antioxidantes vem se intensificando impulsionado pela associação de patologias ao estresse oxidativo. O *Sargassum* é uma alga muito comum nas praias brasileiras e vem se destacando a cada dia pela sua capacidade de produzir compostos bioativos antioxidantes. Este trabalho teve por objetivo analisar o potencial antioxidante do extrato etanólico de *Sargassum sp* coletados na praia de Miramar em Cabedelo-PB, calcular seu IC50, assim como determinar a concentração de proteínas totais solúveis presentes no extrato etanólico. Foi realizada uma extração utilizando três gramas da alga com 12mL de etanol PA, incubada por 24h a 25°C, submetida a um sonificador por um minuto e depois filtrada e concentrada por rota evaporação. As atividades antioxidantes foram medidas utilizando três métodos distintos, DPPH, ABTS e MO⁶⁺ E detectados o IC50 com os seguintes resultados 4,91mg e 187,74 mg para ABTS e DPPH respectivamente. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados de capacidade antioxidante foram expressos em % de inibição dos respectivos radicais livres. O teor de proteína total solúvel foi determinado pelo método de Lowry com 4,578± 0,040 mg/ml. Os resultados obtidos nessa pesquisa permitem a conclusão do alto teor de inibição contra radicais livres que essa alga apresenta, assim como possui valores expressivos de proteínas totais solúveis.

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO *SARGASSUM* sp

Palavras-chave: ABTS. DPPH. *Sargassum*.

INTRODUÇÃO

O metabolismo do corpo humano, assim como a radiação e outros estresses externos são responsáveis pela produção e liberação dos radicais livres e outros derivados ativos do oxigênio, que por sua vez desempenham diferentes reações no metabolismo humano (COOPER, E. L. & MA, M. J., 2017). Segundo Silva et al (2014), o excesso desses subprodutos tem sido a cada dia descrito como potencializadores de alguns estados patológicos, incluindo câncer, doença cardiovascular, distúrbios neurais, doença de Alzheimer, transtorno cognitivo leve, doença de Parkinson. A proteção contra os radicais livres pode ser aumentada pela presença ampla de antioxidantes, presente em diferentes fontes naturais, indicando que alimentos contendo antioxidantes e possivelmente, em particular, os nutrientes antioxidantes, podem ser de grande importância na prevenção de doenças, aumento da imunidade, com tais descobertas, a busca por terapias antioxidantes foi intensificada. (ROCHA et al, 2007; ALAM et al. 2013).

Segundo Mokrani & Madoni (2016), os antioxidantes são substâncias que evitam a ação deletéria dos radicais livres sobre as células sendo compostos capazes de inibir ou retardar o processo de oxidação no organismo ao 'resgatar' um radical livre, combatendo assim o envelhecimento precoce e prevenindo doenças.

Os radicais livres o tempo todo são "combatidos" pelos antioxidantes, os quais podem ser produzidos pelos organismos vivos ou obtidos através de alimentos consumidos. Os antioxidantes podem ser encontrados nos alimentos naturais,

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO *SARGASSUM* *sp*

nos suplementos de vitaminas e minerais. Dependendo do local de atuação de um antioxidante e do mecanismo de inibição frente aos radicais livres os mesmos podem ser classificados em primários, sinergistas, removedores de hidrogênio, agentes biológicos, quelantes e mistos. Antioxidantes multifuncionais são antioxidantes que podem apresentar propriedades antioxidantes primárias e secundárias (RAWAT et al., 2015).

Os antioxidantes primários, os chamados antioxidantes que quebram a cadeia, são capazes de reagir diretamente com os radicais livres, transformando-os em produtos mais estáveis e não-radicais. Assim, os antioxidantes primários desempenham um papel importante na oxidação lipídica porque eles podem reagir com os radicais lipídicos formados e convertê-los em não radicais e, assim, impedir a decomposição adicional dos lipídios (DEKKER, 2002).

Os antioxidantes secundários ou preventivos atuam indiretamente na limitação da oxidação lipídica. Vários mecanismos, incluindo a quelação de metais de transição, quenching singuleto-oxigênio (na foto oxidação), e eliminação de oxigênio podem ser exibidos por esses antioxidantes secundários (DEKKER, 2002). Além disso, alguns antioxidantes secundários podem trabalhar sinergicamente regenerando antioxidantes primários e, assim, restaurar a atividade antioxidante dos antioxidantes primários para garantir sua atividade antioxidante contínua. O ácido ascórbico é um exemplo disso. A capacidade de quelação de metais de um antioxidante secundário é uma propriedade importante para os antioxidantes nos sistemas alimentares porque a oxidação de lipídios induzida por metais é pronunciada em produtos alimentares devido à presença de, por exemplo, ferro. O EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) é um exemplo de um

AValiação DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO *SARGASSUM* *sp* excelente antioxidante quelante de metal usado na indústria alimentícia (HAAHR & JACOBSEN, 2008).

Nogueira (2018) trouxe em seu estudo a relevância das algas por estas estarem se destacando também no cenário de produção de polissacarídeos utilizadas atualmente, destacando sua importância principalmente na indústria alimentícia para produção de sorvetes.

Neste contexto estudos mostram que as diferentes espécies de *Sargassum* vem se destacando quanto a capacidade de produzir diferentes compostos naturais com propriedades antioxidantes (MANSAUDA K. L. R. et al., 2018), esta espécie de alga muito comum no litoral da Paraíba, torna-se uma fonte interessante de estudos. *Sargassum* é um gênero de macroalgas da família Sargassaceae que apresenta aspecto flutuante, constituindo um dos mais representativos dentre os 41 gêneros da ordem *Fucales* (*Phaeophyceae*, *Heterokontophyta*) sendo representado por 340 espécies (ALGAEBASE, 2019). Sendo produtoras de compostos bioativos, utilizadas na indústria dos alimentos e ecologicamente, tem um papel importante para diminuição da poluição produzida pelo descarte humano, atuando como biofiltros marinhos, acumulando metais pesados tóxicos e, assim, diminuindo o impacto prejudicial ao ecossistema local das regiões costeiras litorâneas (WANG, 2008).

O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante por três técnicas diferentes do extrato etanólico de amostras de *Sargassum* coletadas na praia de miramar da cidade de cabedelo- PB e determinar o valor IC₅₀.

MATERIAIS E MÉTODO

O preparo do extrato etanólico das amostras de *Sargassum* (coletados da praia de Miramar em Cabedelo-PB) foram realizados segundo metodologia adaptada de Shanmugam et al. (2019). Três gramas das amostras foram extraídos com 12 mL de etanol PA, incubada por 24h a 25 °C e posteriormente submetida por 1 minuto em um sonicador (50%). Após essa etapa as amostras foram filtradas em papel de filtro, rota-evaporadas 40°C e utilizadas na determinação de proteínas totais e atividade antioxidante.

Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante (AA) in vitro do extrato etanólico foi determinada por três métodos: utilizando do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS); 2,2'-difênil-1-picrihidrazilo (DPPH), e MO^{6+} . Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A atividade antioxidante pelo método ABTS foi determinada de acordo Sánchez-González et al. (2005). Para a preparação do radical $ABTS^+$, foram adicionados, em um frasco âmbar, 5 mL de solução aquosa de ABTS [ácido 2,2 azino-bis(3-etilbenzotiazolina-ácido 6-sulfônico) 7 mM e 88 μ L da solução de persulfato de potássio 140 mM. O frasco foi deixado em repouso, no escuro, por aproximadamente 16 h, para estabilização da solução. A solução de $ABTS^+$ foi diluída em álcool etílico até atingir uma absorbância de $0,700 \pm 0,020$ a 734 nm. As amostras sofreram reação com a solução do radical $ABTS^+$ (proporção 1:10) durante 6 min e as absorbâncias foram lidas a 734 nm (Biospectro, modelo SP-220). Foi construída uma curva padrão de Trolox (ácido 6-hidroxi-2-5-7-8-

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO *SARGASSUM* *sp* tetrametilcromo 2-carboxílico), com uma massa variando de 0,30 µg a 3,32 µg, em álcool etílico.

Para o método DPPH, em 240 µL de cada amostra foi acrescido 1500 µL de solução etanólica do radical livre DPPH 0,04 mg/mL, e incubada por 30 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Como controle foi utilizada uma alíquota de 1500 µl de solução etanólica de DPPH adicionada de 240 µl de etanol. As absorvâncias foram lidas a 517 nm (Biospectro, modelo SP-220). Foi construída uma curva padrão de ácido ascórbico com concentrações variando de 5,0 µg/mL a 30 µg/mL, em álcool etílico.

As atividades sequestrantes de radicais livres de DPPH e ABTS foram expressas em porcentagem de descoloração (% descoloração) pode ser expressa em porcentagem por comparação a um controle ou branco, segundo a seguinte equação:

$$\%ASRL = (\%Descoloração) = ((Ac-At)/Ac)*100$$

Onde:

Ac: absorvância controle ou branco;

At: absorvância teste (amostra).

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de radicais consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial do radical em 50% é denominada concentração eficiente (CE50), também chamada de concentração inibitória (CI50). Quanto maior o

AValiação DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO *SARGASSUM* *sp*
consumo de radical por uma amostra, menor será a sua CE50
e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA et al, 2007).

A atividade antioxidante com formação do complexo fosfomolibdênio seguiu a metodologia descrita por Prieto (1999), na qual consistiu em adicionar 0,3 mL dos extratos (200 µg/mL), em 3 mL do reativo (molibdato de amônio 4 mM, fosfato de sódio 28 mM, ácido sulfúrico 0,6 M). Posteriormente incubou-se em banho-maria a 95 °C por 90 min. após resfriamento foi realizada uma leitura em espectrofotômetro UV a 695 nm, utilizando como branco 0,3 mL água e 3 mL do reativo. A substância referência utilizada foi ácido gálico. A capacidade de redução do extrato foi expressa em mg de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato. A curva padrão foi construída utilizando ácido gálico de 1 a 50 µg.

Determinação de proteínas totais solúveis

O método foi executado conforme descrito por Lowry et al. 1951, utilizando-se as soluções de carbonato de sódio a 2% em hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹; sulfato de cobre 1%; tartarato de sódio e potássio 2%; solução contendo 2% de carbonato de sódio, 0,01% de sulfato de cobre e 0,02% de tartarato de potássio em hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ e o reagente de fenol FolinCiocalteau diluído na proporção de 1:1 (v/v) em água ultrapura. A curva de calibração foi preparada com solução de albumina nas concentrações de 0,15 a 2 mg/mL e efetuada as leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 660 nm. As dosagens foram realizadas em triplicatas.

AValiação DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO *SARGASSUM* sp

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sargassum é um gênero de macroalgas da família Sargassaceae (ALGAEBASE, 2019), muito comum em regiões litorâneas, presentes no litoral paraibano, produtora de compostos bioativos, utilizadas na indústria dos alimentos e ecologicamente, tem um papel importante para diminuição da poluição produzida pelo descarte humano, atuando como biofiltros marinhos, acumulando metais pesados tóxicos e, assim, diminuindo o impacto prejudicial ao ecossistema local das regiões costeiras litorâneas (WANG, 2008). Tornando-se um produtor de compostos bioativos naturais interessante para estudo de antioxidantes com potencial a ser explorado, uma vez que é de fácil acesso nos litorais brasileiros. Nesta vertente o presente trabalho avaliou o potencial antioxidantes de extrato etanólico de *Sargassum* coletados da praia de Cabedelo- PB e utilizando a metodologia de quantificação do radical ABTS⁺, os teores de atividade antioxidante e a reta padrão para trolox estão na Figura 1. Este método é aplicável ao estudo de antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis, compostos puros e extratos vegetais (CAVALARO et al, 2017).

Os resultados apresentados na Figura 1 baseiam-se na geração do ABTS⁺, de cor azul esverdeado, por meio da reação do ABTS com persulfato de potássio que possui absorção máxima em 734nm. Com a adição do extrato etanólico em diferentes concentrações foi detectado a atividade antioxidante proporcional à perda da coloração do meio reacional e foi determinado o índice de descoloração conforme a aplicação da equação e plotado no gráfico de variação de massa de substrato por índice de descoloração do ABTS, como é observado na Figura 1a. O ensaio com diferentes massas do extrato bruto serviu para estimar a concentração de extrato com

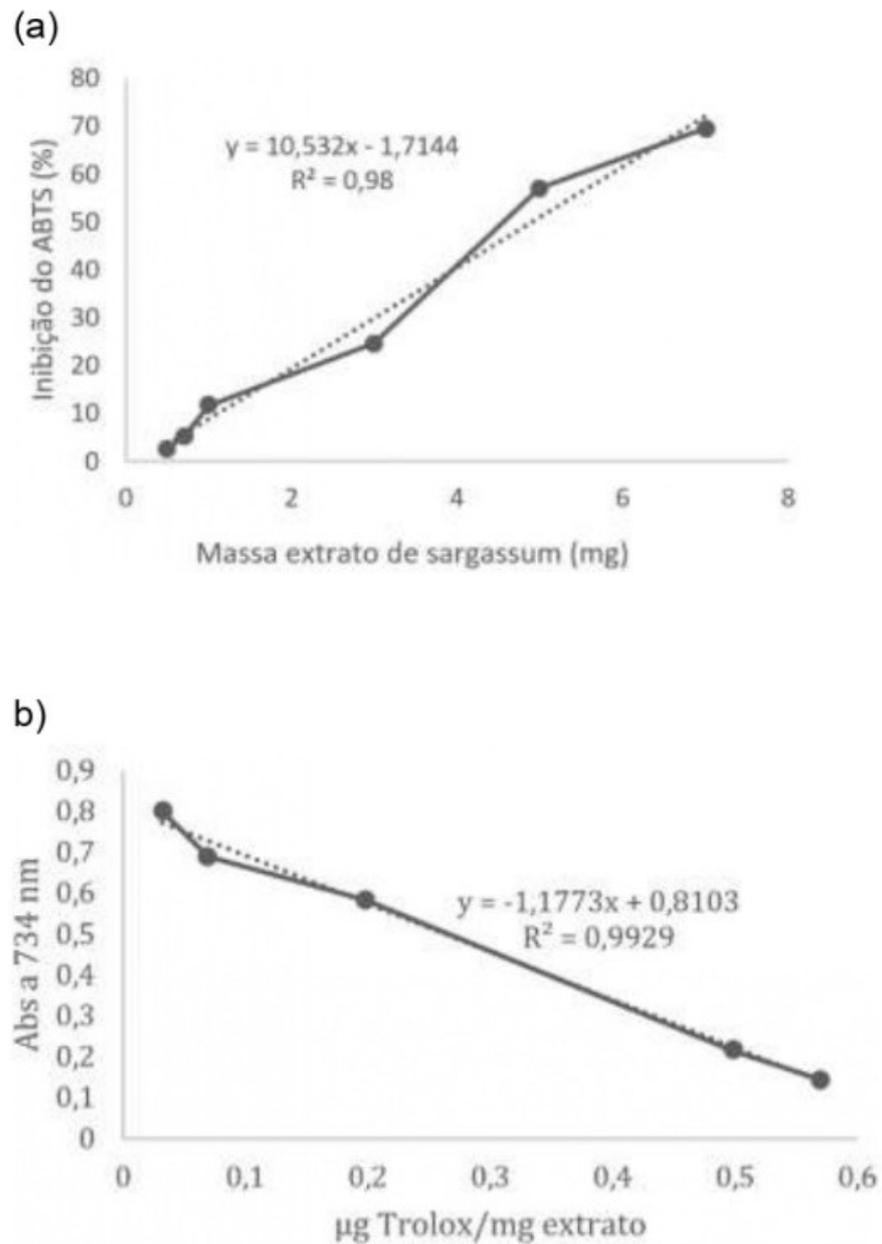
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO *SARGASSUM* *sp*

melhor potencial antioxidante e calcular o IC₅₀, concentração efetiva à qual o extrato induz metade do efeito máximo, que no presente experimento foi detectado no valor de 4,91mg de extrato etanólico. Na Figura 2b é apresentada a reta padrão do ABTS correspondentes aos valores de µg Trolox/mg extrato etanólico obtendo um R² de 0,9929, indicando que houve uma correlação linear entre a equivalência em µg trolox/mg de extrato e a atividade antioxidante, indicando a confiabilidade do método utilizado na presente análise.

O teste de DPPH é um dos métodos indiretos para se determinar a atividade antioxidante mais antigo sendo sugerido originalmente em 1950 para se descobrir os doadores de hidrogênio em materiais naturais. Esse método consiste em avaliar a capacidade antioxidante via atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila – DPPH. O radical DPPH possui coloração púrpura absorvendo a um comprimento de onda máximo de aproximadamente 516 nm. Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R.), o DPPH. é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou porcentagem de DPPH. remanescente no meio reacional. O DPPH apresenta-se como um método simples podendo também ser usado para avaliar a atividade antioxidante de formas sintéticas (ex: nimesulida, dapsona e ácido acetilsalicílico), algas, quitosanas, etc., (KIM; THOMAS, 2006). Os resultados obtidos pelo etanólico e do ácido ascórbico, utilizando a metodologia de DPPH estão apresentados na Figura 2.

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO *SARGASSUM* *sp*

Figura 1. Atividade antioxidante pelo método ABTS dos extratos etanólico de *Sargassum* coletados da praia de Miramar na cidade de Cabedelo- PB (a) e reta padrão com trolox (b).



Fonte: (Dados da pesquisa)

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO *SARGASSUM sp*

No presente estudo, foi determinada os valores do IC 50 da atividade antioxidante do extrato etanólico *Sargassum sp* e do ácido ascórbico frente ao radical DPPH com valores de 187,74 mg (extrato) e 5,504µg/mL de ácido ascórbico. Revathi et al. (2018), trabalhando com os polissacarídeos isolados de *Sargassum sp*. detectou que estes compostos apresentavam atividades antioxidantes pelos dois métodos utilizados no presente trabalho e os resultados obtidos deram valores de IC₅₀ significativo indicando que o polissacarídeo isolado do *Sargassum sp* inibe os radicais livres e podem ser usados no tratamento de células tumorais.

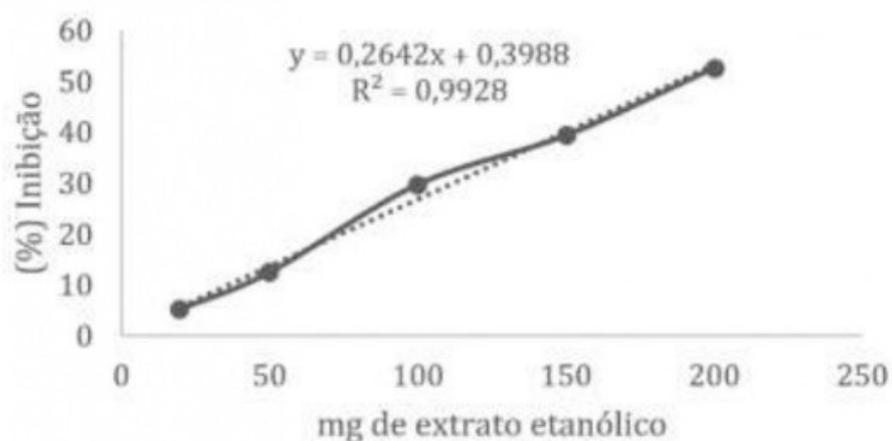
Vasconcelos et al. (2019) enquanto trabalhava com o potencial antioxidante das algas coletadas em Recife-PE submeteu-as aos testes de DPPH e ABTS e os resultados encontrados entram em concordância com os do presente estudo.

No método de fosfomolibdênio, considerado reprodutível e de baixo custo e que mede a capacidade antioxidante total utilizando como padrão o ácido gálico, os resultados obtidos no presente trabalho estão apresentados na Figura 3. Os resultados apresentados utilizando o ácido gálico indicam uma boa linearidade com valor de R² de 0,9946 a qual se mantém na análise do experimento utilizando o extrato etanólico de *Sargassum sp* mas com valores bastante inferiores aos detectados por diferentes autores em outros experimentos utilizando extratos vegetais, tais resultados, embora não sejam extremamente discrepantes tráz a reflexão do quanto o meio ambiente e as condições climáticas afetam essa alga, por atuar como biofiltro marinho é altamente mutável a depender da época do ano e da poluição local (NEGRI et al., 2008; NOGUEIRA, 2017).

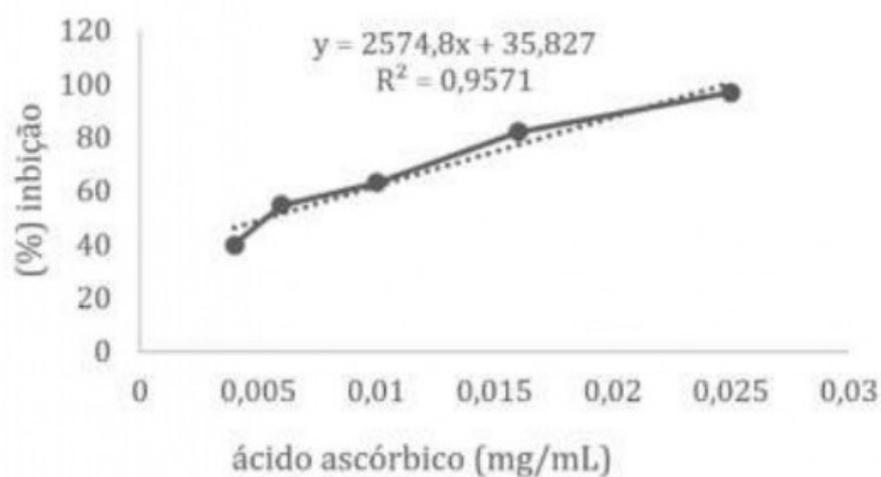
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO *SARGASSUM* *sp*

Figura 2- Capacidade de sequestro do radical DPPH versus extrato etanólico de *Sargassum* *sp* (a) e capacidade de sequestro do radical DPPH versus concentrações do padrão de ácido ascórbico (b)

(a)



(b)

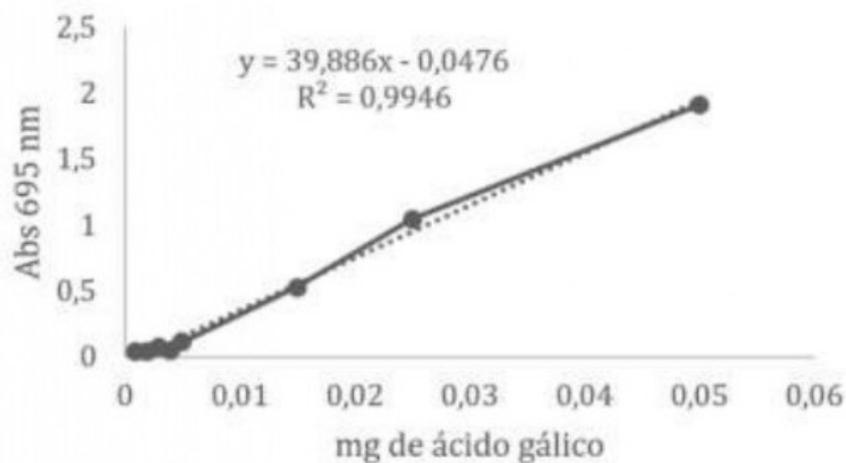


Fonte: (Dados da pesquisa)

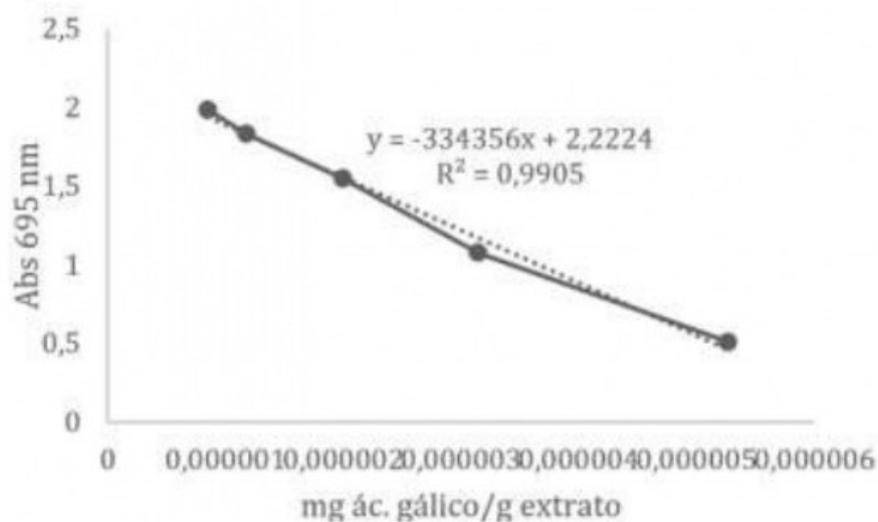
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO *SARGASSUM* sp

Figura 3- Atividade antioxidante total pelo método de fosfomolibdênio.

a)



b)



Fonte: (Dados da pesquisa)

No presente estudo buscou-se a avaliação do teor proteico do extrato etanólico de *Sargassum* coletados da praia

AValiação DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO *SARGASSUM* *sp* de Cabedelo- PB utilizando a metodologia de quantificação proteica pelo método de Lowry que em condições alcalinas as substâncias presentes no reagente colorimétrico Folin Ciocalteu interagem com as proteínas da amostra gerando um complexo de cor azul que pode ser medido num espectrofotômetro no comprimento de onda de 750 nm. A técnica é bastante sensível e permitiu a determinação de maneira precisa, no experimento realizado, elaborou-se uma curva padrão com albumina de soro bovino (BSA) como solução padrão, onde obteve-se um fator de calibração médio para calcular a concentração de proteínas nas amostras e este valor foi de $4,578 \pm 0,040$ mg/mL.

Ao observar todos os resultados obtidos nessa pesquisa, assim como o cenário de busca por estilos de vida mais saudável, melhor aproveitamento de recursos e substituição de produtos sintéticos por naturais, faz-se necessário um maior investimento em estudos que proporcionem uma utilização vantajosa desses recursos naturais.

CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados encontrados neste estudo permitem a conclusão que o extrato etanólico do *Sargassum* possui uma alta atividade antioxidante, além de uma concentração considerável de proteínas solúveis, este fato evidencia o potencial dessa alga como uma rica fonte de compostos bioativos naturais que podem ser utilizados no combate aos radicais livres, trazendo melhorias para o metabolismo celular. Além disso, as características naturais do *sargassum* o transforma numa opção perfeita para a indústria alimentícia, na utilização como conservante.

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO *SARGASSUM* *sp*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addie A. van der Sluis,, Matthijs Dekker,* , Grete Skrede, and Wim M. F. Jongen **Activity and Concentration of Polyphenolic Antioxidants in Apple Juice.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002 50 (25), 7211-7219
- ALAM, M. N., BRISTID N.J., RAFIQUZZAMAN M., **Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity.** *Saudi Pharmaceutical Journal*, V. 21, P.143-152, 2013.
- ALGABASE, 2019. Disponível em <<http://www.algaebase.org/browse/taxonomy/?id=5187> acessado no dia 08 de abril de 2019
- Ann-Dorit Moltke Sørensen, Anne-Mette Haahr, Eleonora Miquel Becker, Leif H. Skibsted, Björn Bergenståhl, Lars Nilsson, and Charlotte Jacobsen, **Interactions between Iron, Phenolic Compounds, Emulsifiers, and pH in Omega-3-Enriched Oil-in-Water Emulsions.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008 56 (5), 1740-1750
- CAVALARO, Renata Iara. **Atividade antioxidante de extratos de própolis verde em sistemas lipídicos emulsionados.** 2017. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, University of São Paulo, Piracicaba, 2017. doi:10.11606/D.11.2017.tde-29092017-182112. Acesso em: 2019-11-07
- COOPER, E. L.; MA, M. J. **Alzheimer Disease: Clues from traditional and complementary medicine.** *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7, 380, 2017.
- COSCRATO, G.; PINA, J.C.; MELLO, D.F. **Utilização de atividades lúdicas na educação em saúde: uma revisão integrativa da literatura.** *Acta Paul Enferm*, v.2, n.23, p.257-63, 2010.
- FREIRE, P. **Pedagogia da autonomia: saberes necessários a prática educativa.** 25ª ed., Editora Paz e Terra, São Paulo, 1996.
- GUEDES, D. P. et al. **Níveis de prática de atividade física habitual em adolescentes.** *Revista Brasileira de Medicina Esportiva*, v.7, n.6, p. 187-199, nov./dez. 2006.
- LOWRY, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- MANSAUDA K.L.R., ANWAR E., NURHAYATI T. **Antioxidant and Anti-Collagenase Activity of Sargassum plagyophyllum Extract as an Anti-Wrinkle Cosmetic Ingredient.** *Pharmacogn J.* 10(5):932-936, 2018.
- MOKRANI A., MADANI K. **Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit.** *Separation and Purification Technology*, v. 162, p. 6876, 2016.
- NEGRI, Myrian Lane Soares *et al.* **Atividade antioxidante das folhas de**

- AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO *SARGASSUM* *sp* **espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas.** Brazilian Journal of Pharmacognosy , [S. l.], p. 553-556, 1 mar. 2018.
- PRIETO P, PINEDA M, AGUILAR M. **Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a fosphomolybdenum complex: specific aplication to the determination of vitamin E.** Anal Biochem 269: 337-341,1999.
- RAWAT D. S., JOSHI G., LAMBA B. Y., TIWARI A. K. KUMAR P. **The effect of binary antioxidant proportions on antioxidant synergy and oxidation stability of Jatropha and Karanja biodiesels.** Energy, v. 84, p. 643-655, 2015.
- REVATHI, K.; SENTHIKUMARI, S. **ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACT FROM OPHIOCOMA ERINACEUS AND OPHIOMASTRIX ANNULOSA.** World Journal of Pharmaceutical Research , [S. l.], v. 7, n. 13, p. 496-505, 6 maio 2018.
- SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, I. et al. **In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter).** Food Chemistry, [S. l.], v. 90, n. 1-2, p. 133-139, 3 abr. 2015
- SILVA, Camila Tainah da; JASIULIONIS, Miriam Galvonas. **Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer.** Cienc. Cult., São Paulo , v. 66, n. 1, p. 38-42, 2014 . Available from <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252014000100015&lng=en&nrm=iso>. access on 07 Nov. 2019.
- SOUSA, C. M. M. et al. **Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais.** Química Nova , v.30, n.2, p. 351-355, 2007.
- THOMAS, Noel Vinay; KIM, Se-Kwon. **Potential pharmacological applications of polyphenolic derivatives from marine brown algae.** Environmental Toxicology and Pharmacology, [S. l.], v. 32, n. 3, p. 325-335, 7 nov. 2019.
- VASCONCELOS, J. B. et al. **Antioxidant activity of three seaweeds from tropical reefs of Brazil: potential sources for bioprospecting.** Journal of Applied Phycology, v. 31, n. 2, p. 835–846, 2019.
- WANG, W.; YANG, X.; CHEN, S.; ZHANG, C.; CHEN, L. & XIE, W. **Method for preparing biscuit from Sargassum.** Patente no A21D13/08; A21D2/36; A23L1/164; A23L1/29; A23L1/337. Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu. pp. 1-6, 2008