



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BACHARELADO)

SAMUEL FREIRE FREITAS

**EPS BACTERIANO: AVALIAÇÃO DE RENDIMENTO E POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO COMO SURFACTANTE**

FORTALEZA

2022

SAMUEL FREIRE FREITAS

EPS BACTERIANO: AVALIAÇÃO DE RENDIMENTO E POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO COMO SURFACTANTE

Trabalho de Conclusão de curso apresentado ao curso de graduação em Ciências Biológicas (Bacharelado) do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F938e Freitas, Samuel Freire.
EPS bacteriano : avaliação de rendimento e potencial biotecnológico como surfactante / Samuel Freire
Freitas. – 2022.
27 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2022.
Orientação: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.

1. Triagem. 2. Exopolissacarídeo. 3. Emulsão. I. Título.

CDD 570

SAMUEL FREIRE FREITAS

EPS BACTERIANO: AVALIAÇÃO DE RENDIMENTO E POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO COMO SURFACTANTE

Trabalho de Conclusão de curso apresentado ao curso de graduação em Ciências Biológicas (Bacharelado) do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.

Aprovada em: 10/02/2022.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Camila Tauane Monteiro do Nascimento
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Dra. Maria Cristiane Rabelo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

À minha tia Raimunda Nonatta dos Santos Santiago por todo apoio nos estudos e por ter me feito sentir paixão pelo conhecimento.

Aos meus pais pelo suporte financeiro durante a graduação.

Aos meus amigos Giovanni Sousa Marques, Isabel Cristina Gonçalves Pinto e David Rezende da Silveira, pelos momentos que dividiram comigo desde que entrei na faculdade e por me inspirarem de formas diferentes a continuar no meu caminho.

Ao meu Professor e amigo Dr. Jorge Iván Sánchez Botero por ter me inspirado a continuar na ciência, pelas conversas e por todo o apoio durante minha graduação.

Ao meu amigo Alan Victor dos Santos Teles por ter me ajudado em todas as “emergências eletrônicas”.

À Família Casellato pelo apoio emotivo e por me incentivar sempre.

Ao Prof. Dr. Cleverson Diniz Teixeira de Freitas pelo incentivo na pesquisa e por ter colaborado com meu desenvolvimento acadêmico.

À Profa. Dra. Camila Tauane Monteiro do Nascimento Porfírio por toda a “mentoria científica”, pelos diálogos, discussões, gargalhadas e apoio prestado.

Ao Prof. Dr. Vicente Vieira Faria pela paciência, excelente coordenação, ética e pelos diálogos que tivemos.

Ao Prof. Dr. Lorenzo Roberto Sgobaro Zanette pelo ensino de Evolução Biológica, ótimas piadas e por ter tornado o final da graduação muito mais interessante.

À Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo, minha orientadora e principal fonte de inspiração profissional para mim.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelas bolsas de estudo dentro da minha graduação e auxílio financeiro que me possibilitou continuar os meus estudos.

À toda equipe Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBIOTECH) e, em especial, Dra. Talita Camila Evaristo da Silva Nascimento, Dra. Mirella Leite Pereira, Dra. Maria Cristiane Rabelo e à mestranda Luzia Gabrielle Zeferino de Castro por todos os ensinamentos e grande ajuda na realização deste trabalho. Sem vocês, seria impossível realizar os experimentos e coletar os resultados.

À Bruna Andrade de Sousa, por tudo.

RESUMO

Biofilmes são estruturas biológicas em formas de agregados de células que possuem propriedades aderentes à substratos sólidos, interfaces de água ou emulsões. O principal elemento constituinte do biofilme é uma matriz extracelular formada por substâncias poliméricas chamada de exopolissacarídeos ou EPS. Os EPS são os principais responsáveis pela estrutura, integridade funcional e propriedades físico-químicas dos biofilmes, apresentando várias funções para a sobrevivência das células. Há um crescente interesse no estudo de EPS para aplicação biotecnológica em setores industriais, biorremediação e nas ciências médicas. Esse estudo apresentou uma triagem de bactérias para produção de exopolissacarídeos, extração de EPS das bactérias selecionadas, testes de emulsões para avaliar o potencial biotecnológico como um biosurfactante, tempo de formação de biofilme, eficiência de produção de EPS por célula e quantificação de proteínas e carboidratos totais. Houve inversão de fase de emulsão de uma das bactérias selecionadas e um aumento de eficiência em índices de emulsão. Além disso, esse estudo permite projeções futuras para caracterização da composição química dos EPS, análise de inversão de fase de emulsão e otimização de produção de EPS por meio de alteração de variáveis.

Palavras-chave: triagem; exopolissacarídeo; emulsão.

ABSTRACT

Biofilms are biological structures in the form of cell aggregates that have adherent properties to a solid surfaces (substratum), water interfaces or emulsions. The main constituent element of the biofilm is an extracellular matrix formed by polymeric substances called exopolysaccharides or EPS. EPS are primarily responsible for the structure, functional integrity and physicochemical properties of biofilms, presenting several functions for cell survival. There is a growing interest in the study of EPS for biotechnology application in industrial sectors, bioremediation and in the medical sciences. This study presented a screening of bacteria for exopolysaccharide production, EPS extraction from selected bacteria, emulsion tests to assess the biotechnological potential as a biosurfactant, biofilm formation time, EPS production efficiency per cell and quantification of proteins and carbohydrates totals. There was an inversion of the emulsion phase of one of the selected bacteria and an increase in efficiency in emulsion indices. In addition, this study allows future projections for characterization of the chemical composition of EPS, analysis of emulsion phase inversion and optimization of EPS production by changing variables.

Keywords: screening; exopolysaccharides; emulsion.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	METODOLOGIA	9
2.1	Triagem para seleção de bactérias produtoras de EPS	9
2.2	Contagem em placas – Técnica de Superfície	9
2.3	Fermentação para formação de biofilme	10
2.4	Primeira Extração de EPS	10
2.5	Teste de Emulsão	10
2.6	Segunda Extração de EPS	11
2.7	Método Colorimétrico para Quantidade de Carboidratos Totais	11
2.8	Método Bradford para Quantidade de Proteínas Totais	11
3	RESULTADOS OBTIDOS E DISCUSSÃO	13
3.1	Triagem para seleção de bactérias produtoras de EPS	13
3.2	Contagem em placas – Técnica de Superfície	14
3.3	Fermentação para formação de biofilme	14
3.4	Primeiro Teste de Emulsão	18
3.5	Segundo Teste de Emulsão	18
3.6	Método Colorimétrico para Quantidade de Carboidratos Totais	20
3.7	Método Bradford para Quantidade de Proteínas Totais	21
4	CONCLUSÃO	23
	REFERÊNCIAS	24

1 INTRODUÇÃO

A maioria dos micro-organismos vivem de maneira agregada em forma de biofilmes e flocos (biofilmes planctônicos), os quais possuem propriedades aderentes à substratos sólidos até interfaces de água ou emulsões. O elemento comum formador desse biofilme é uma matriz extracelular de substâncias poliméricas, também denominada de EPS (WINGENDER; NEU; FLEMMING, 1999). Wingender, Neu e Flemming (1999, p.1, tradução nossa) afirmam que “Biofilmes são acumulações de micro-organismos, EPS, cátions multivalentes, partículas orgânicas e inorgânicas e componentes coloidais e dissolvidos”. Desses, o EPS é o principal responsável pela estrutura, integridade funcional e são aceitos como componentes principais que determinam as propriedades físico-químicas e biológicas dos biofilmes. Embora a denominação mais comum de EPS seja em referência à polissacarídeos extracelulares, devido às pesquisas iniciais envolvendo o tema, atualmente sabemos que muitas macromoléculas participam da estrutura química como proteínas, ácidos nucleicos, componentes anfífilos e substâncias húmicas (NOUHA et al., 2018).

Os exopolissacarídeos (EPS) podem se localizar na superfície celular (capsular) ou fora da célula (*slime*), além de poderem ser o resultado de diferentes processos como: Secreção ativa da célula, liberação de material para superfície celular, lise celular e adsorção do ambiente (SALAMA et al., 2015). Os EPS estão sujeitos a degradação biótica (enzimas) ou abióticas, modificações e processos de condensação. Esse processo de degradação está vinculado à ecologia microbiana, pois a catálise dessas reações pode resultar em potenciais fontes de energia e carbono, servindo como um estoque energético para as células (PHAM et al., 2020; SINGH et al., 2015; ZHANG; BISHOP, 2003). As funções mais comuns atribuídas aos EPS são: adesão à superfícies, barreira protetiva, sorção de componentes orgânicos e inorgânicos, retenção de água e atividades enzimáticas, evasão bacteriana contra a defesa do sistema imunológico (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004; KUMAR; MODY; JHA, 2007; NWODO; GREEN; OKOH, 2012; SRIRAMULU et al., 2005).

Há um interesse particular nos EPS quanto ao potencial biotecnológico que essas moléculas podem oferecer. Por exemplo, o xanthan é usado comercialmente como um estabilizante de misturas tanto na indústria de alimentos quanto em cosméticos (KATZBAUER, 1998), o dextran é utilizado como componentes de soluções para tratamento de certos traumas e patologias (BELDER, 1993; HEINZE et al., 2006) e o alginato é um formador de gel e estabilizante e está relacionado ao sistema de *drug delivery* (LEE; MOONEYA, 2012; TØNNESEN; KARLSEN, 2002). Além disso, Kumar, Mody e Jha (2007,

tradução nossa) mostram outros exemplos de aplicações de EPS em tratamentos contra tumores, formação de anticorpos, agentes formadores de gel, emulsificantes, removedores de metais pesados, recuperadores de óleo e são fontes de monossacarídeos.

Nesse contexto, foi realizada uma triagem inicial de 5 bactérias para produção de exopolissacarídeos com o objetivo de visualizar uma formação rápida de biofilme nas colônias e analisar quais tinham potencial para produzir EPS. Além das colônias selecionadas após a triagem foi adicionada uma colônia que já foi previamente isolada de *Bacillus amyloliquefaciens* intitulada de JAG248. A escolha da adição desse micro-organismo é justificada por relatos na literatura de produção de EPS envolvendo essa espécie (DEKA et al., 2018; ZHAO et al., 2018). Após a seleção, foi realizada a fermentação em tempos variados e com tempos de parada até visualizarmos a formação de biofilme no meio de cultura. O tempo de crescimento das culturas sem agitação foi realizado para que fosse possível a formação de biofilme por meio da comunicação entre as células (*quorum sensing*), como é respaldado na literatura (FREDERICK et al., 2011; HAMMER; BASSLER, 2003; NADELL et al., 2008; TAN et al., 2014). Existem vários métodos de extração de EPS documentados na literatura (D'ABZAC et al., 2009; LIU; FANG, 2002; NIELSEN; JAHN, 1999), mas foram escolhidos os métodos de centrifugação e precipitação com etanol por efeitos práticos e de menor custo, já que um dos objetivos do trabalho era avaliar a eficiência de produção de EPS pelas células. Após a extração, foram realizados testes de emulsão para avaliarmos o potencial biotecnológico dos EPS como possíveis emulsificantes. Após a seleção, foi realizada a quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford (KRUGER, 2009) e a quantificação de carboidratos totais pelo método colorimétrico (DUBOIS et al., 1956).

2 METODOLOGIA

As bactérias isoladas para a triagem foram previamente isoladas e identificadas por gênero pelo Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBIOTECH), com exceção da bactéria codificada como BCPL7.

As bactérias selecionadas e o código de identificação são: *Brucella sp.* – FOR1703; *Pseudomonas sp.* – FOR1702; *Alcanivorax sp.* – FOR1701; *Alcanivorax sp.* – FOR1706; *Acinetobacter sp.* – FOR1503 e a bactéria desconhecida – BPCL7.

Foi estabelecida uma densidade óptica (OD_{600}) de 0.500 para cada bactéria. Foi utilizada solução salina 0,9% autoclavada para a diluição até atingir um valor próximo ao mencionado. As análises foram utilizando uma cubeta de acrílico.

Como já mencionado na introdução, além das bactérias descritas, foi adicionada outra bactéria por conta de suas propriedades previamente conhecidas em produção de EPS cujo código é JAG248 (*Bacillus amyloliquefaciens*) (DEKA et al., 2018; ZHAO et al., 2018).

2.1 Triagem para seleção de bactérias produtoras de EPS

Foi seguido o protocolo de Paulo *et al.* (2012) com modificações. Cada bactéria previamente isolada foi inoculada em um Erlenmeyer contendo 20mL de meio TGE (Tryptona 5g/L – Glicose 1g/L – Extrato de Levedura 2,5g/L) e foram colocadas sob agitação de 150rpm, à 30°C e por 24 horas.

Após esse período, foi feita uma diluição utilizando meio TGE (mesmas composições) como diluente em proporção 1:10. Após a diluição, foram inoculados 5 μ L de cada cultura em discos de papel filtro estéreis (5 milímetros de diâmetro) em placas de Petri contendo meios ATGE (Ágar 15g/L – Tryptona 5g/L – Glicose 20g/L – Extrato de Levedura 2,5g/L) e ATSE (Ágar 15g/L – Tryptona 5g/L – Sacarose 20g/L – Extrato de Levedura 2,5g/L).

Seis colônias foram testadas em cada placa. As placas foram incubadas à 30°C por 24 horas. Após a incubação, a produção de EPS foi inferida pela formação de colônias com biofilme ao redor do disco. As análises foram conduzidas em duplicata.

2.2 Contagem em placas – Técnica de Superfície

As bactérias selecionadas na etapa 2.1 foram escolhidas para fazer a contagem de células sob a superfície de placas de Petri. Inicialmente, foi realizada uma diluição seriada

utilizando solução salina 0,9% estéril como diluente até a 10^{-7} e colocamos uma alíquota de 0,1mL das diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} em placas de Petri contendo meio ATGE (Ágar 15g/L – Triptona 5g/L – Glicose 1 g/L – Extrato de Levedura 2,5g/L). A alíquota foi espalhada sobre o meio com o auxílio de uma alça de Drigalsky até a absorção total. Após isso, as placas foram incubadas à 37°C por 48 horas.

2.3 Fermentação para formação de biofilme

As bactérias selecionadas na etapa 2.1 cresceram sob as mesmas condições iniciais. Após o ajuste da OD₆₀₀, foi inoculada uma quantidade referente a 1% (v/v) de cultura em Erlenmeyers contendo 150mL de meio TGE (Triptona 5g/L – Glicose 20g/L – Extrato de Levedura 2,5g/L).

Foram divididos dois grupos de inóculos: 1) Os inóculos ficaram sob agitação (150rpm, 30°C e 24 horas) e depois ficaram 48 horas em estase à 30°C; e 2) Os outros inóculos ficaram sob agitação constante durante 72 horas (mesmas condições de rotação do primeiro grupo). Foi medida a OD₆₀₀ no final dessa etapa e os experimentos foram feitos ao mesmo tempo.

Após as 72 horas, os dois grupos foram deixados em estase à 30°C por 96 horas. Foi realizada uma nova leitura de OD₆₀₀.

2.4 Primeira Extração de EPS

O protocolo de extração de EPS foi o de Yang *et al.* (2018) com modificações. Primeiro, as células foram removidas por centrifugação à 8000g à 4°C por 40 minutos. Então, foi adicionado ao sobrenadante uma quantidade referente à 3 vezes o volume de etanol gelado 95% (v/v). A mistura foi mantida à 4°C por 24 horas.

Após esse procedimento, o material foi centrifugado à 11000g à 4°C por 60 minutos. O material insolúvel (*pellet*) foi solubilizado em 2mL de água destilada.

2.5 Teste de Emulsão

Foi seguido o protocolo de Cooper e Goldenberg (1987) com modificações. A atividade emulsificante foi avaliada pela adição de 2mL de querosene e 2mL de amostra aquosa, utilizando o vórtex em alta velocidade por 2 minutos. O resultado foi registrado em

fotografias 24 horas depois. A porcentagem de emulsão foi obtida pela altura da camada de emulsão dividida pela altura total no tubo e multiplicada por 100.

2.6 Segunda Extração de EPS

O protocolo de fermentação para formação de biofilme escrito no tópico 2.3 foi repetido para as bactérias que tiveram melhor resultado com o teste de emulsão, descrito no tópico 2.5. Os volumes aumentaram para 500mL de inóculo, feitos em duplicata. A proporção de etanol gelado 95% mudou para 1:1 por conta do grande volume dos inóculos e porque temos dados na literatura que mostram que a proporção de álcool não altera no rendimento de EPS (OLEKSY-SOBCZAK; KLEWICKA; PIEKARSKA-RADZIK, 2020).

Os inóculos foram deixados em um freezer que chegou próximo à 8°C por 24 horas, ou seja, uma temperatura maior que o recomendado para extração de EPS. O tempo de centrifugação da amostra foi reduzido por conta do grande volume de inóculo e por ter sido consultado outros resultados na literatura mostrando tempos variados na centrifugação de extração (DEKA *et al.*, 2018; OLEKSY-SOBCZAK; KLEWICKA; PIEKARSKA-RADZIK, 2020; ZHAO *et al.*, 2018).

Os inóculos foram armazenados no freezer por 72 horas até tudo ser centrifugado. Após isso, o *pellet* foi solubilizado em 10mL de água destilada. Com essa amostra, foi refeito o teste de emulsão seguindo o mesmo procedimento descrito no tópico 2.5 e foram realizadas as análises de quantidade de carboidratos e proteínas totais.

2.7 Método Colorimétrico para Quantidade de Carboidratos Totais

Foi seguido o protocolo de Dubois *et al.* (1956) com modificações. Foi reduzido a proporção para 0,5mL de amostra, 0,5mL de Fenol 5% e 2,5mL de ácido sulfúrico concentrado. O açúcar escolhido como comparação foi a glicose e, por isso, a leitura foi feita à 490nm. Foi utilizada uma equação da reta para determinar a concentração da amostra. Se a amostra for diluída, o valor será multiplicado pelo fator de diluição.

2.8 Método Bradford para Quantidade de Proteínas Totais

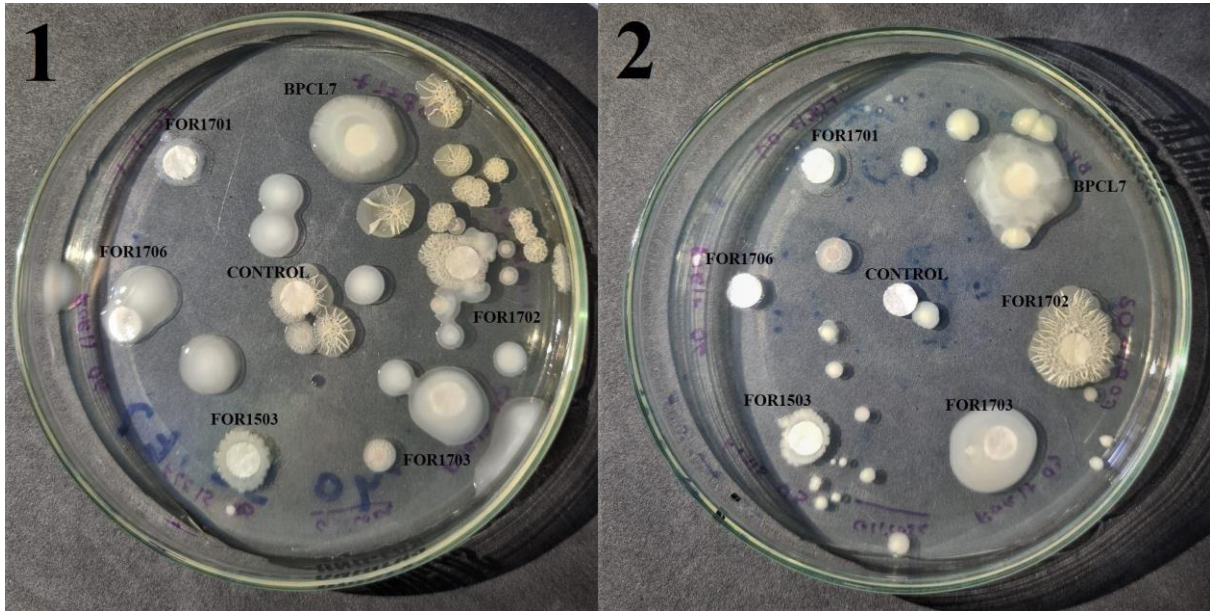
Foi seguido o protocolo de Kruger (2009) referente ao ensaio padrão. Foi utilizada a albumina sérica bovina como proteína padrão e foi utilizada uma equação da reta para

determinar a concentração da amostra. Se a amostra for diluída, o valor será multiplicado pelo fator de diluição.

3 RESULTADOS OBTIDOS E DISCUSSÃO

3.1 Triagem para seleção de bactérias produtoras de EPS

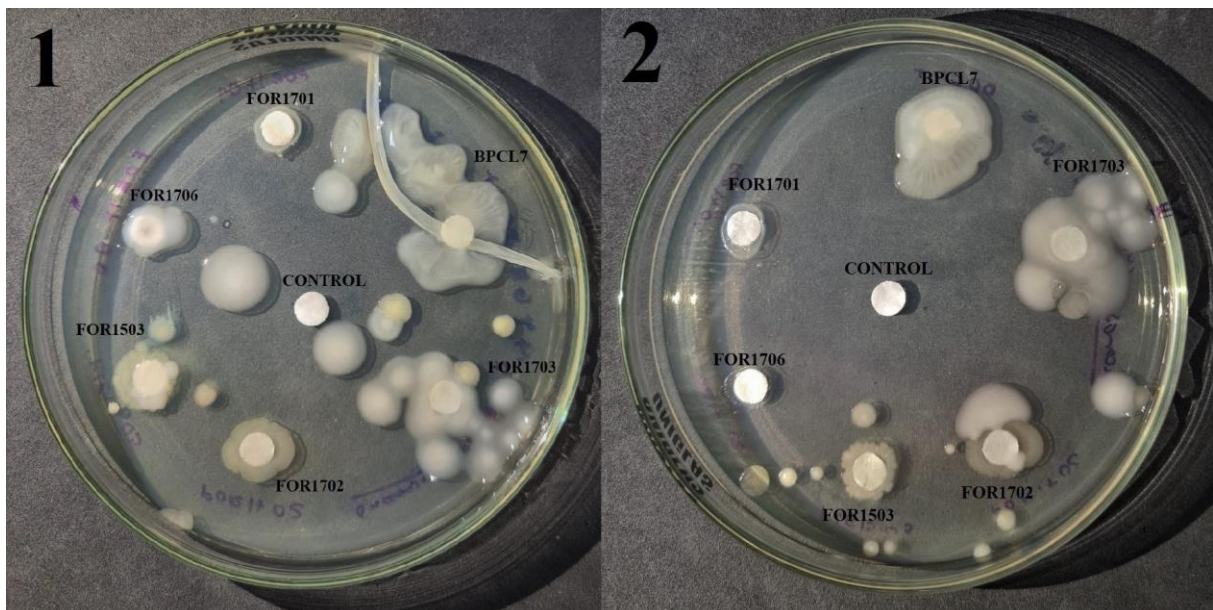
Figura 1 – Triagem realizada com meio ATGE usando Glicose 20g/L



Fonte: Fotografia elaborada pelo autor.

Figura 1. Na placa 1 aconteceu uma contaminação do controle, onde houve crescimento da FOR1702 (*Pseudomonas* sp.). Em ambas as placas foi visualizado um espalhamento da FOR1703 (*Brucella* sp.).

Figura 2 – Triagem realizada com meio ATGE usando Sacarose 20g/L



Fonte: Fotografia elaborada pelo autor.

Figura 2. Na placa 1 houve a observação de um halo realizado pela BPCL7 (bactéria contaminante). Novamente, foi observado um espalhamento da FOR1703 (*Brucella* sp.) na placa 1 e um crescimento significativo da FOR1703 e BPCL7 em ambas.

Depois da triagem foram escolhidas as bactérias BPCL7 e FOR1703 com base no crescimento e produção de biofilme. Não foram observadas diferenças significativas de produção de biofilme, morfologia ou crescimento bacteriano ao variar a fonte de carboidrato utilizado. Desse modo, foi escolhida a glicose como fonte de carboidrato para as próximas análises por ser um monossacarídeo e ser mais presente na literatura. A alta concentração de glicose e sacarose estão relacionadas à maior eficiência de produção de biofilme reportada na literatura (WALDROP *et al.*, 2014; TRULEAR; CHARACKLIS, 1982).

3.2 Contagem em placas – Técnica de Superfície

Tabela 1 – Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

Bactérias	Diluição					
	1: 10 ⁵		1:10 ⁶		1:10 ⁷	
JAG248	249	298	Não realizado		Não realizado	
BCPL7	>300	>300	166	162	22	21
FOR1703	>300	>300	>300	>300	41	44

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 1. As contagens da JAG248 já tinham sido feitas em um estudo prévio e, por isso, não há contagem realizada em diluições maiores.

FOR1703 apresentou uma maior quantidade de UFCs por volume. Essa informação é condizente com o crescimento presentes nos inóculos. As Tabelas 2 e 3 apresentam esses dados.

3.3 Fermentação para formação de biofilme

Tabela 2 – OD₆₀₀ lida para realizar a inoculação

Bactéria	Densidade Óptica
JAG248	0.587
BPCL7	0.521
FOR1703	0.573

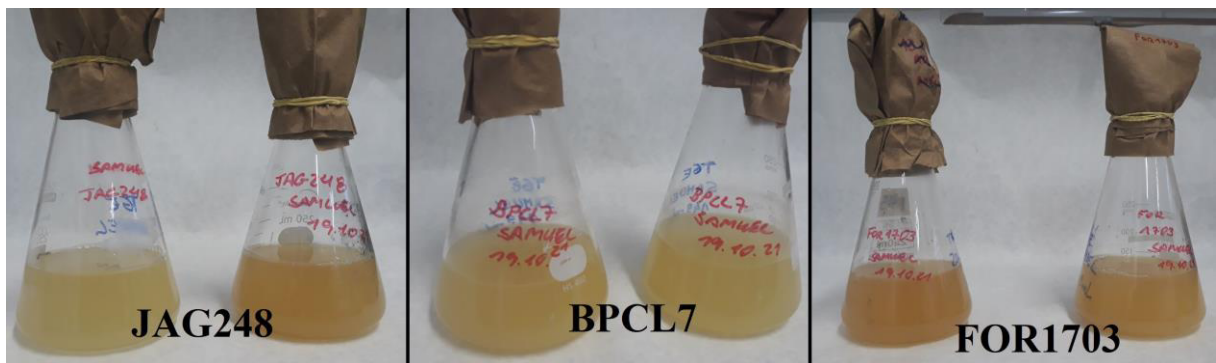
Fonte: Elaborada pelo autor. Dados da pesquisa

Há na literatura muitas menções à formação de biofilme por meio de *quorum sensing* em bactérias (FREDERICK *et al.*, 2011; HAMMER; BASSLER, 2003; NADELL *et al.*, 2008; TAN *et al.*, 2014) e, por isso, foi decidido formar dois grupos onde um dos inóculos ficaria sob estase depois de 24 horas de agitação e o outro grupo ficaria sob agitação por 72

horas. O objetivo desse experimento foi elucidar se o tempo de agitação interferiria na formação de biofilme e se é possível obter um maior rendimento com um crescimento bacteriano maior. Essa hipótese foi confirmada e visualizada na Figura 4, cujas fotografias foram tiradas ao mesmo tempo.

Após a inoculação, houve uma nova leitura dos inóculos após 72 horas (Grupos 1 e 2), onde foi possível observar uma produção de biofilme e algumas alterações de leitura de OD₆₀₀ decorrentes dos tempos de incubação distintos. O Grupo 1 se refere ao primeiro grupo mencionado na metodologia, enquanto o Grupo 2 se refere ao segundo grupo. Os dados referentes à essa observação estão na Tabela 3.

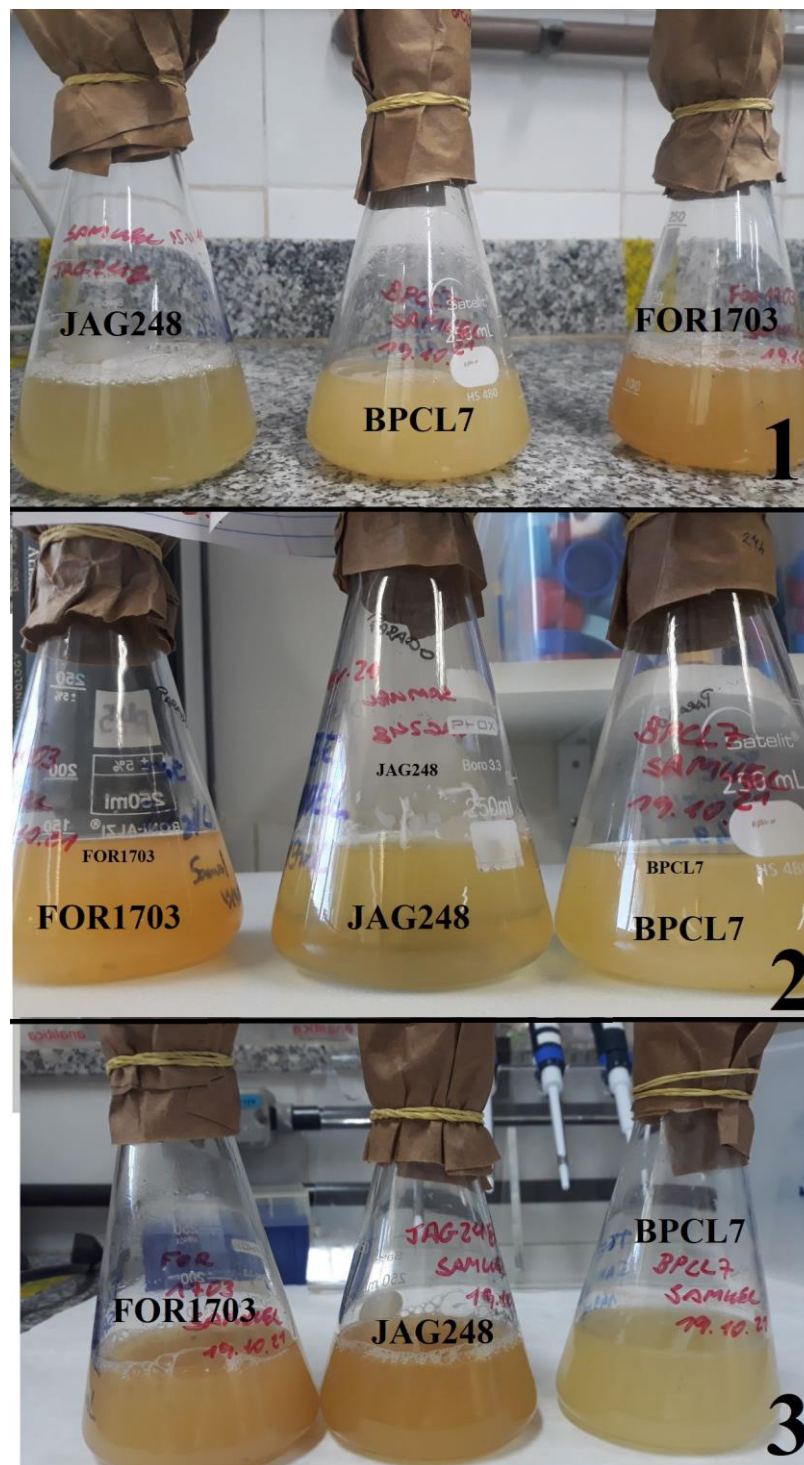
Figura 3 – Inóculos depois de 24 horas de agitação



Fonte: Fotografia elaborada pelo autor.

Figura 3. JAG248 apresenta coloração diferente entre as duas duplicatas e não há aspecto visual de formação de biofilme em nenhuma das amostras. Fotografia tirada antes da divisão dos grupos.

Figura 4 – Tempo de Estase dos inóculos em períodos diferentes

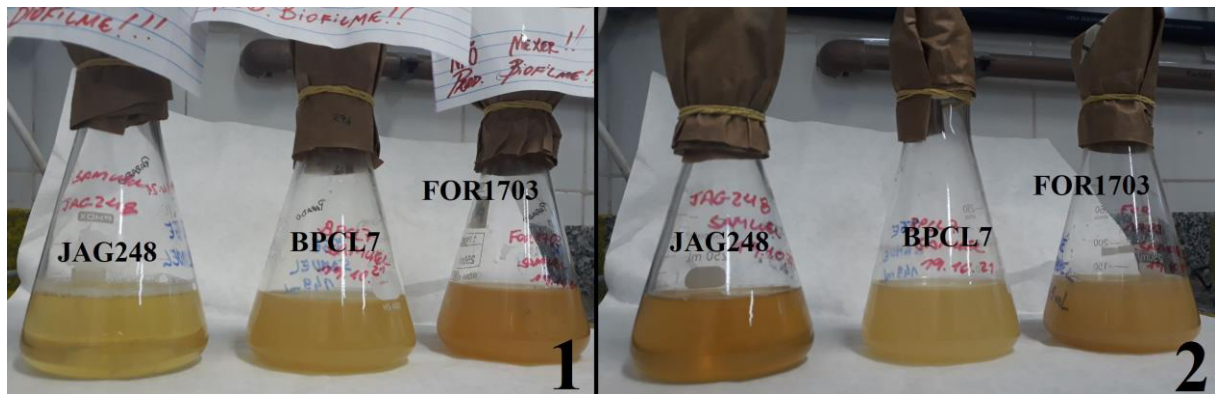


Fonte: Fotografia elaborada pelo autor.

Figura 4. (1) 1º Grupo: JAG248, BPCL7 e FOR1703 foram fermentados por 24 horas à 30°C e depois passaram 24 horas em estase. (2) 1º Grupo: JAG248, BPCL7 e FOR1703 fermentados por 24 horas e depois passaram 48 horas em estase à 30°C. (3) 2º Grupo: JAG248, BPCL7 e FOR1703 depois de 72 horas sob agitação constante.

Foi notório o aparecimento de formação de biofilme após a estase dos inóculos, tendo diferenças visuais em cada meio. JAG248 apresentou perda de turbidez e uma formação de biofilme na superfície no líquido, enquanto as outras bactérias possuíam um biofilme fragmentado que estava presente no próprio meio de cultura.

Figura 5 – Grupos de inóculos após 96 horas de estase à 30°C



Fonte: Fotografia elaborada pelo autor.

Figura 5. (1) 1º Grupo. (2) 2º Grupo.

Os dois grupos foram submetidos à uma estase à 30°C por 96 horas para visualizarmos a diferença do tempo de agitação em relação ao rendimento de biofilme pelos inóculos. Esses resultados foram registrados na Tabela 3 por meio da leitura da OD₆₀₀ antes e depois da estase em conjunto.

GRUPOS	COLÔNIA	ANTES	DEPOIS
1	JAG248	0.074/0.243/0.065	0.032
	BPCL7	1.398	1.003
	FOR1703	1.241	1.138
2	JAG248	1.181	0.113
	BPCL7	1.158	1.077
	FOR1703	1.741	1.782

Tabela 3 – OD₆₀₀ dos inóculos antes e depois da estase à 30°C

Fonte: Elaborada pelo autor. Dados da pesquisa.

Tabela 3. Grupo 1 – Ficou sob agitação constante por 24 horas e, após isso, foi armazenado em uma estufa à 30°C, ficando parado; Grupo 2 – Ficou sob agitação constante por 72 horas e, após isso, foi armazenado em uma estufa à 30°C, ficando parado (em estase).

O objetivo desse experimento foi elucidar a influência da agitação na formação do biofilme e o tempo necessário para a formação deste. É notório que a JAG248 do Grupo 1 se destacou pela instabilidade na leitura antes do período de estase (motivo de ter tido 3 leituras) e isso está de acordo com o resultado expresso na Figura 4, onde o meio de cultivo perdeu

turbidez conforme o tempo se passou em estase. A JAG248 do Grupo 2 também sofreu uma redução grande de OD₆₀₀ em decorrência da formação do biofilme. Não houve uma redução de OD₆₀₀ significativa na FOR1703 nem na BPCL7 nos dois grupos. Isso provavelmente aconteceu porque as células dessas duas colônias não se organizaram em biofilmes planctônicos, como na JAG248. Visualmente, JAG248 apresentou uma formação significativa de biofilme na interface do líquido.

3.4 Primeiro Teste de Emulsão

Após a extração, foi realizado um teste de emulsão. Os resultados foram registrados na Tabela 4.

Tabela 4 – Primeiro Teste de Emulsão

GRUPO	BACTÉRIA	TIPO DE EMULSÃO	PORCENTAGEM DE EMULSÃO
1	JAG248	Óleo/Água	60%
	BPCL7	Óleo/Água	20%
	FOR1703	Óleo/Água	15,38%
2	JAG248	Óleo/Água	57,14%
	BPCL7	Óleo/Água	53,3%
	FOR1703	Óleo/Água	35,7%

Fonte: Elaborada pelo autor. Dados da pesquisa.

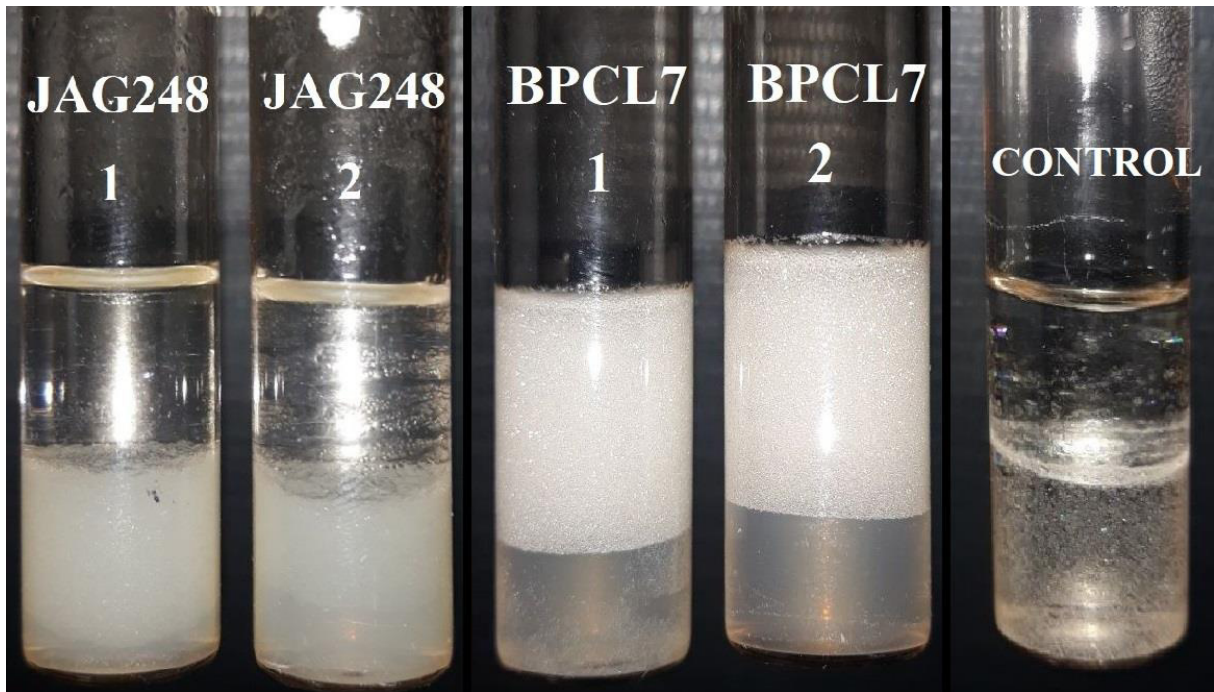
Por meio dos resultados das emulsões foi descartado a produção da FOR1703 por não apresentar um resultado satisfatório. JAG248 apresentou um bom resultado nos dois grupos, mas foi escolhido o menor tempo de agitação por questões de otimização. BPCL7 do segundo grupo apresentou um resultado muito melhor e é possível que isso seja devido ao número de células pelo tempo de crescimento ter sido maior. Desse modo, a JAG248 do grupo 1 e a BPCL7 do grupo 2 foram escolhidas para serem produzidas em maiores volumes de inóculo.

3.5 Segundo Teste de Emulsão

Foi realizado um segundo teste de emulsão para garantir a eficiência e confirmar os resultados anteriores, mesmo com as modificações apontadas durante o processo de extração. Os resultados estão expressos na Figura 6 e Tabela 5. Além disso, foi mostrado

também um comparativo com o primeiro teste em relação à JAG248 e esse resultado está presente na Figura 7.

Figura 6 – Segundo Teste de Emulsão



Fonte: Fotografia elaborada pelo autor.

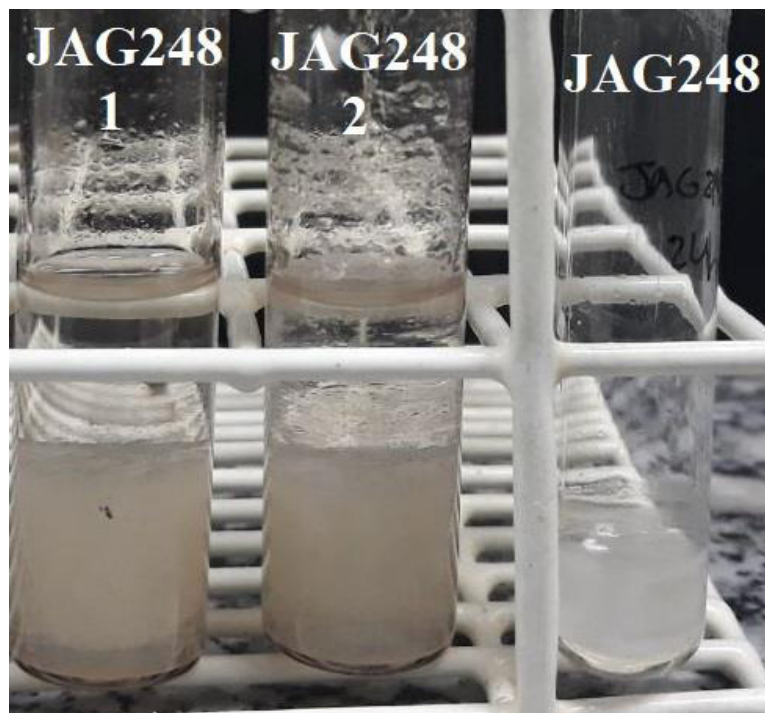
Figura 6. A análise foi realizada em duplicata, onde foram obtidos valores bem próximos aos anteriores.

Tabela 5 – Segundo Teste de Emulsão

COLÔNIA	TIPO DE EMULSÃO	PORCENTAGEM DE EMULSÃO	MÉDIA DA PORCENTAGEM
JAG248	Água/Óleo	53,5%	52,6%
	Água/Óleo	51,7%	
BPCL7	Óleo/Água	68,9%	68,9%
	Óleo/Água	68,9%	

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7 – Comparativo entre testes de emulsão da JAG248



Fonte: Fotografia elaborada pelo autor.

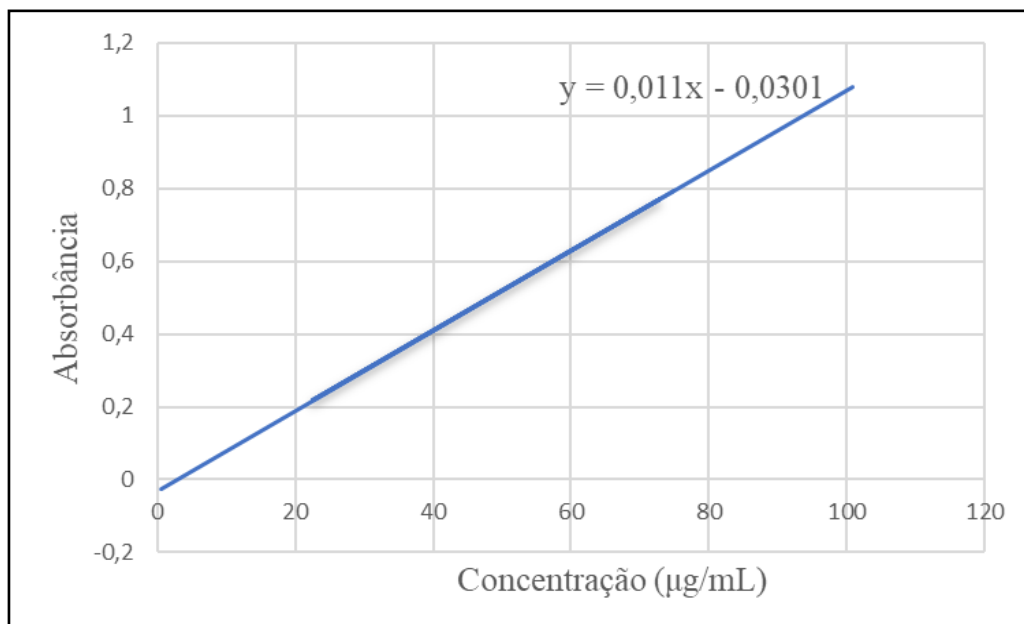
Figura 7. Os dois tubos à esquerda mostram o resultado do segundo teste de emulsão, enquanto o tubo que está mais à direita mostra o resultado do primeiro teste de emulsão. É visualizado uma inversão de fases.

O resultado da BPCL7 foi melhor que o esperado enquanto que a JAG248 mudou de fase em relação ao tipo de emulsão. Algumas hipóteses podem ser levantadas para isso ter acontecido. Primeiro, o tempo de extração foi maior por conta do grande volume de líquido a ser centrifugado (72 horas); segundo, o local que as amostras foram colocadas para realizar a extração não chegava à 4°C, estando em uma temperatura maior e; terceiro, o tempo de centrifugação foi menor devido ao grande volume de inóculo, podendo ter afetado a extração de algumas moléculas. Não foi encontrado nada na literatura sobre isso.

3.6 Método Colorimétrico para Quantidade de Carboidratos Totais

Nessa etapa, houve um interesse em quantificarmos os carboidratos presentes na matriz de EPS com o objetivo de comparar as proporções de biomoléculas entre as colônias e preparar amostras para futuras caracterizações. Esse teste foi realizado com a amostra do segundo processo de extração de EPS. Foi feita uma curva padrão utilizando glicose em concentrações diferentes e foi obtido o Gráfico 1.

Gráfico 1 – Curva Padrão de Glicose



Fonte: Elaborado pelo autor. Dados da Pesquisa.

A partir da construção da curva padrão, foram feitas leituras das amostras no espectrofotômetro e os resultados foram utilizados na fórmula obtida por meio da construção da curva. Os dados estão expressos na Tabela 6, na qual mostra uma concentração maior na JAG248.

Tabela 6 – Concentração de Carboidratos das Bactérias Selecionadas

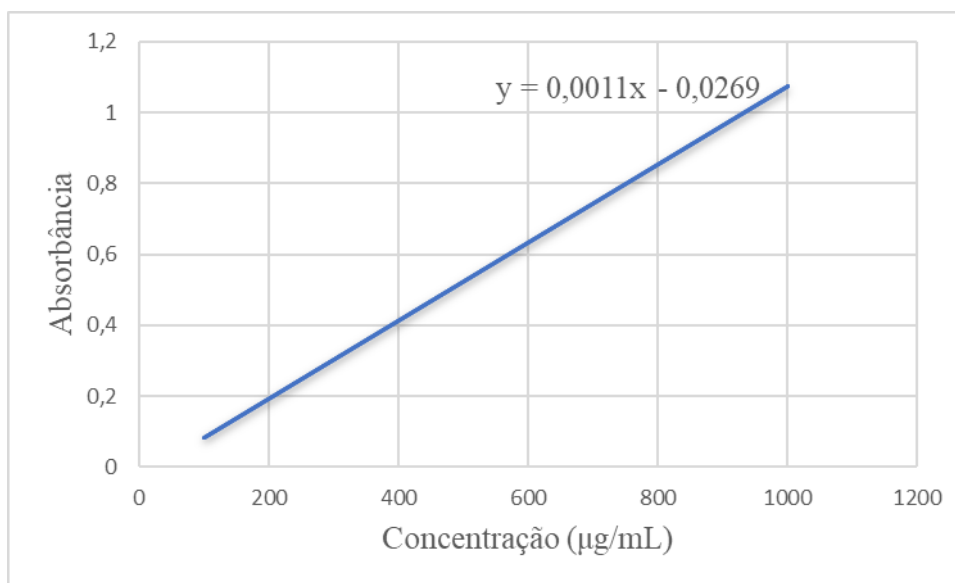
BACTÉRIA	OD ₄₉₀		DILUIÇÃO	CONCENTRAÇÃO (µg/mL)	CORREÇÃO (µg/mL)
	LEITURAS	MÉDIA			
JAG248	0.444 0.346 0.465	0.418	1:100	40,74	4.074
BPCL7	0.273 0.283 0.269	0.275	1:100	27,74	2.774

Fonte: Elaborada pelo autor. Dados da pesquisa.

3.7 Método Bradford para Quantidade de Proteínas Totais

Nessa etapa, houve um interesse em quantificarmos as proteínas presentes na matriz de EPS com o objetivo de comparar as proporções de biomoléculas entre as colônias e preparar amostras para futuras caracterizações. Esse teste foi realizado com a amostra do segundo processo de extração de EPS. Foi feita uma curva padrão utilizando albumina sérica bovina em concentrações diferentes e foi obtido o Gráfico 2.

Gráfico 2 – Curva Padrão da Albumina Sérica Bovina



Fonte: Elaborada pelo autor. Dados da pesquisa.

A partir da construção da curva padrão, foram feitas leituras das amostras no espectrofotômetro e os resultados foram utilizados na fórmula obtida por meio da construção da curva. Os dados estão expressos na Tabela 7, na qual mostra uma concentração maior na JAG248.

Tabela 7 – Concentração de Proteínas das Bactérias Seleccionadas

BACTÉRIA	OD ₅₉₅				VALORES CORRIGIDOS	DILUIÇÃO	CONCENTRAÇÃO (µg/mL)
	LEITURAS			MÉDIA			
JAG248	0.474	0.464	0.461	0.466	0.165	1:4	503
BPCL7	0.498	0.523	0.527	0.516	0.215	1:1	171
H ₂ O (BRANCO)	0.285	0.301	0.317	0.301	-	1:1	-

Fonte: Elaborada pelo autor. Dados da pesquisa.

Tabela 7. Os valores corrigidos se referem à subtração do valor da média pelo BRANCO do experimento. Os valores corrigidos foram multiplicados pelo fator de diluição e aplicados na fórmula.

4 CONCLUSÃO

O método de triagem foi muito eficiente para seleção de bactérias produtoras de biofilme, favorecendo uma otimização do processo de fermentação. A contagem em placas foi uma inferência de crescimento condizente com as leituras na OD₆₀₀ e foi um parâmetro importante para entender a relação de crescimento bacteriano e produção de biofilme. A partir da primeira extração de EPS e o primeiro teste de emulsão, foi possível visualizar que a quantidade de biofilme produzida não é necessariamente algo que se traduz em eficiência para conseguirmos obter um bom índice de emulsão. A segunda extração mostrou um resultado condizente com a primeira extração em relação à eficiência de produção e propriedades emulsificantes da BPCL7. Contudo, essa mesma etapa experimental mostrou uma inversão de fase de emulsão da JAG248, ainda que esta tenha apresentado um resultado melhor. Os métodos de quantificação de carboidratos e proteínas foram realizados para averiguarmos se há relação de proporção entre esses componentes em relação à uma boa propriedade de emulsificação e verificamos que a JAG248 apresenta uma quantidade maior dessas moléculas em sua composição.

O presente estudo levanta outras dúvidas à respeito de EPS. A projeção para pesquisas futuras seriam de entender o porquê da inversão de fase da JAG248, caracterização da composição química dos EPS presentes nas duas bactérias selecionadas e testar protocolos de otimização de produção desses EPS com meios de cultura e outras variáveis. Além disso, os testes de emulsão realizados inferem um bom potencial biotecnológico para a manufatura de biosurfactantes com aplicações na indústria de cosméticos ou para utilização como um agente removedor de resíduos químicos em biorremediação. Seriam necessários ensaios específicos para cada aplicação.

REFERÊNCIAS

- BELDER, ANTHONY N.DE. DEXTRAN. *In*: WHISTLER, ROY L.; BEMILLER, JAMES N. **Industrial Gums: Polysaccharides and Their Derivatives**. 3. ed. [S. l.]: Academic Press, 1993. cap. 4, p. 399-425. ISBN 978-0-08-092654-4. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080926544500188>. Acesso em: 20 jan. 2022.
- COOPER, David G.; GOLDBERG, Beena G. Surface-Active Agents from Two *Bacillus* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987. DOI <https://doi.org/10.1128/aem.53.2.224-229.1987>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/aem.53.2.224-229.1987>. Acesso em: 27 jan. 2022.
- D'ABZAC, Paul *et al.* Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from anaerobic granular sludges: comparison of chemical and physical extraction protocols. **Environmental Biotechnology: Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 85, p. 1589–1599, 28 out. 2009. DOI <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2288-x>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-009-2288-x#citeas>. Acesso em: 20 jan. 2022.
- DEKA, Priyadarshini *et al.* Bacterial exopolysaccharide promotes acid tolerance in *Bacillus amyloliquefaciens* and improves soil aggregation. **Molecular Biology Reports**, [s. l.], v. 46, p. 1079–1091, 15 dez. 2018. DOI <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4566-0>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11033-018-4566-0>. Acesso em: 20 jan. 2022.
- DUBOIS, Michel *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956. Disponível em: https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac60111a017?casa_token=P5pYEAWYnPYAAAAA:hfMg8XtD7CFYTEXQ1tBnHdu9DeYL4WiGEYPiHxFXpQ5IhWGXHkd_-9aoMwFeoi5GqLtEJ-3rW5FBhfwo. Acesso em: 20 jan. 2022.
- FREDERICK, Mallory R *et al.* A mathematical model of quorum sensing regulated EPS production in biofilm communities. **Theoretical Biology and Medical Modelling**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. 1-29, 10 abr. 2011. DOI <https://doi.org/10.1186/1742-4682-8-8>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/1742-4682-8-8#citeas>. Acesso em: 20 jan. 2022.
- HALL-STOODLEY, Luanne; COSTERTON, J. William; STOODLEY, Paul. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 2, p. 95-108, 2004. DOI <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro821#citeas>. Acesso em: 20 jan. 2022.
- HAMMER, Brian K.; BASSLER, Bonnie L. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 101–114, 20 ago. 2003. DOI <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03688.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2958.2003.03688.x>. Acesso em: 20 jan. 2022.
- HEINZE, T. *et al.* Functional Polymers Based on Dextran: Production and Application of Dextran. *In*: KLEMM, D. **Polysaccharides II: Advances in Polymer Science**. [S. l.]: Springer, Berlin, Heidelberg, 2006. v. 205, cap. 3, p. 212-216. ISBN 978-3-540-37103-8. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/12_100#citeas. Acesso em: 20 jan. 2022.

LEE, Kuen Yong; MOONEYA, David J. Alginate: Properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 106-126, 2012. DOI <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>. Acesso em: 20 jan. 2022.

LIU, Hong Liu; FANG, Herbert H.P. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 95, n. 3, p. 249-256, 23 abr. 2002. DOI [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00025-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00025-1). Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00025-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00025-1). Acesso em: 20 jan. 2022.

KATZBAUER, Barbara. Properties and applications of xanthan gum. **Polymer Degradation and Stability**, [s. l.], v. 59, p. 81-84, 3 jan. 1998. DOI [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(97\)00180-8](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(97)00180-8). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141391097001808>. Acesso em: 20 jan. 2022.

KRUGER, Nicholas J. The Bradford Method For Protein Quantitation. *In*: WALKER, John M. **The Protein Protocols Handbook**. 3. ed. [S. l.]: Humana Press, Totowa, NJ, 2009. cap. 4, p. 17-24. ISBN 978-1-60327-474-6. Disponível em: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-59745-198-7#about>. Acesso em: 20 jan. 2022.

KUMAR, Anita Suresh; MODY, Kalpana; JHA, Bhavanath. Bacterial exopolysaccharides: a perception. **Journal of Basic Microbiology**, [s. l.], v. 47, p. 103–117, 17 abr. 2007. DOI <https://doi.org/10.1002/jobm.200610203>. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jobm.200610203?casa_token=dREv4AVwe7AAAAAA:bhRbLGEUuvpgq8w3r8eA1prseOBmQwecTcGR2kxDJ2tMAZcMEAmcGFmBI_V9LTp59IHgQyh5vvEMYRSU. Acesso em: 20 jan. 2022.

NADELL, Carey D *et al.* The Evolution of Quorum Sensing in Bacterial Biofilms. **PLoS Biology**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 171-179, 29 jan. 2008. DOI <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060014>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.0060014>. Acesso em: 20 jan. 2022.

NIELSEN, Per H.; JAHN, Andreas. Extraction of EPS. *In*: WINGENDER, J; NEU, T.R.; FLEMMING, HC. **Microbial Extracellular Polymeric Substances**. [S. l.]: Springer, Berlin, Heidelberg, 1999. cap. 3, p. 50-69. ISBN 978-3-642-60147-7. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-60147-7_3#citeas. Acesso em: 20 jan. 2022.

NOUHA, Klai *et al.* Critical review of EPS production, synthesis and composition for sludge flocculation. **Journal of Environmental Sciences**, [s. l.], v. 66, p. 225-245, 2018. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.05.020>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S100107421631227X>. Acesso em: 20 jan. 2022.

NWODO, Uchechukwu U.; GREEN, Ezekiel; OKOH, Anthony L. Bacterial Exopolysaccharides: Functionality and Prospects. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 13, p. 14002-14015, 30 out. 2012. DOI

<https://doi.org/10.3390/ijms131114002>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/13/11/14002#cite>. Acesso em: 20 jan. 2022.

OLEKSY-SOBCZAK, Magdalena; KLEWICKA, Elżbieta; PIEKARSKA-RADZIK, Lidia. Exopolysaccharides production by *Lactobacillus rhamnosus* strains: Optimization of synthesis and extraction conditions. **LWT: Food Science and Technology**, [s. l.], v. 122, p. 1-8, 2020. DOI <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109055>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643820300438>. Acesso em: 29 jan. 2022.

PAULO, Elinalva Maciel *et al.* An alternative method for screening lactic acid bacteria for the production of exopolysaccharides with rapid confirmation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 4, n. 32, p. 710-714, dez. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612012005000094>>. Acesso em: 10 jan. 2022.

PHAM, P. L. *et al.* Production of Exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and Analysis of Its Enzymatic Degradation during Prolonged Fermentation. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 66, n. 6, p. 2302-2310, 17 dez. 2020. DOI <https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2302-2310.2000>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AEM.66.6.2302-2310.2000>. Acesso em: 20 jan. 2022.

SALAMA, Youssef *et al.* Characterization, structure, and function of extracellular polymeric substances (EPS) of microbial biofilm in biological wastewater treatment systems: a review. **Desalination and Water Treatment**, [s. l.], v. 57, n. 35, p. 16220-16237, 19 ago. 2015. DOI <https://doi.org/10.1080/19443994.2015.1077739>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19443994.2015.1077739>. Acesso em: 20 jan. 2022.

SINGH, Vineeta *et al.* Enzymatic Degradation of Bacterial Biofilms Using *Aspergillus clavatus* MTCC 13231. **Microbiology**, [s. l.], v. 84, n. 1, p. 59-64, 4 fev. 2015. DOI <https://doi.org/10.1134/S0026261715010130>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1134/S0026261715010130>. Acesso em: 20 jan. 2022

SRIRAMULU, Dinesh D *et al.* Microcolony formation: a novel biofilm model of *Pseudomonas aeruginosa* for the cystic fibrosis lung. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 54, n. 7, p. 667-676, 1 jul. 2005. DOI <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45969-0>. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.45969-0?crawler=true>. Acesso em: 20 jan. 2022.

TAN, Chuan Hao *et al.* The role of quorum sensing signalling in EPS production and the assembly of a sludge community into aerobic granules. **International Society for Microbial Ecology**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 1186-1197, 16 jan. 2014. DOI 10.1038/ismej.2013.240. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24430488/>. Acesso em: 20 jan. 2022.

TØNNESEN, Hanne Hjorth; KARLSEN, Jan. Alginate in Drug Delivery Systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 621-630, 17 jun. 2002. DOI <https://doi.org/10.1081/DDC-120003853>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1081/DDC-120003853>. Acesso em: 20 jan. 2022.

TRULEAR, Michael G.; CHARACKLIS, William G. Dynamics of biofilm processes. **Journal WPCF**: (Water Pollution Control Federation), [s. l.], v. 54, n. 9, p. 1288-1301, 1982. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/25041684>. Acesso em: 29 jan. 2022.

WALDROP, Robert *et al.* Biofilm Growth Has a Threshold Response to Glucose in Vitro. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, [s. l.], v. 472, n. 11, p. 3305-3310, 6 mar. 2014. DOI 10.1007/s11999-014-3538-5. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4182383/>. Acesso em: 13 jan. 2022.

WINGENDER, Jost; NEU, Thomas R.; FLEMMING, Hans-Curt. What are Bacterial Extracellular Polymeric Substances?. In: WINGENDER, J.; NEU, T.R.; FLEMMING, H.-C. **Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function**. [S. l.]: Springer Berlin Heidelberg, 1999. cap. 1, p. 1-19. ISBN 3642601472. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-60147-7_1. Acesso em: 20 jan. 2022.

YANG, Yanfang *et al.* Isolation, purification and characterization of exopolysaccharide produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* YF32 from soybean paste. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 114, p. 529-535, 27 mar. 2018. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.162>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29601876/>. Acesso em: 13 jan. 2022.

ZHANG, Xiaoqi; BISHOP, Paul L. Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances. **Chemosphere**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 63-69, 2003. DOI [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00319-3](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00319-3). Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00319-3](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00319-3). Acesso em: 20 jan. 2022.

ZHAO, Wen *et al.* Characterization and Antioxidant Activity of the Exopolysaccharide Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* GSBa-1. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 28, n. 8, p. 1282-1292, 2018. DOI <https://doi.org/10.4014/jmb.1801.01012>. Disponível em: <https://www.koreascience.or.kr/article/JAKO201827750146377.page>. Acesso em: 20 jan. 2022.