universidade federal de pelotas
CDTec
centro de desenvolvimento tecnológico

PPGB
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
SAÚDE ÚNICA

ANAIS DA IV MOSTRA ACADÊMICA

Setembro/2020

SUMÁRIO

Bioinformática - Graduação

001 ANA CLAUDIA OLIVEIRA DE FREITAS 001
Análises estruturais de lectinas de *Musa acuminata* de diferentes espécies através de ferramentas bioinformáticas

002 IANKA JACONDINO NUNES 006
Estudos farmacocinéticos e toxicológicos *in silico* de derivados pirazol-organocalcogênios

003 IZABELLA CRISTINA SILVA 011
Análise de genes candidatos a reguladores da determinação de castas em abelhas

004 JOÃO CARLOS RODRIGUES JUNIOR 016
Comparação por docking molecular da atividade de curcumina e seus análogos em receptores envolvidos no câncer de bexiga

005 JULIA WEBER FERRABOLI 021
Desenho de primers *in silico* como potencial marcador molecular para Plasmodium falciparum utilizando bioinformática

006 MABELLE CARDIA NUNES DOS SANTOS 026
Análises *in silico* de lectinas de *Musa acuminata ssp.* Malaccensis: uma abordagem estrutural

Bioinformática – Pós-graduação

007 RENAN EUGÊNIO ARAUJO PIRAINE 031
Metagenoma das cervejas de fermentação mista

Biotecnologia Ambiental – Graduação

008 NATÁLIA MADRUGA ARRIEIRA 036
Avaliação do crescimento celular de *Spirulina sp.* leb 18 cultivada com suplementação de glicerol.

009 PATRICIA DE FRANÇA MARINS 041
Biotecnologia e meio ambiente: um conciso diagnóstico sobre a degradação de poliuretanos

Biotecnologia Ambiental – Pós-graduação

010 ADRIANO RAYOL DA SILVA 046
Avaliação comportamental em bivalves após exposição a uma substância neurotóxica, utilizando o marisco branco *Amarilladesma mactroides* como modelo biológico

011 VITHÓRIA CAROLYNA TRINDADE DOS SANTOS 051
Avaliação do potencial de biodegradação microbiana em óleo diesel sob diferentes condições de cultivo.

Biotecnologia Animal – Graduação

012 EDUARDO FLORENTINO SILVA 056
Biotecnologia aplicada na reprodução de bovinos: uma revisão bibliográfica

013 JORDANI BORGES CARDOSO 061
Administração do Butafosfan sobre o consumo, produção de leite e parâmetros comportamentais de vacas leiteiras

014 KAUANI BORGES CARDOSO..... 066
Utilização de Butafosfan no comportamento alimentar e produção de vacas leiteiras no pós-parto recente

Biotecnologia Animal – Pós-graduação

015 KAUANE NAYARA BAHR LEDEBUHR..... 071
Envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo da benzamida n-3-(fenilselenil)prop-2-in-1-ílica em camundongos

016 LAURA DALL'AGNO 076
Isolamento de uma cepa probiótica do gênero bacillus nativa do trato intestinal do camarão *Litopenaeus vannamei* com potencial para aplicação biotecnológica

017 LAURA DE VASCONCELOS COSTA..... 081
Alimentação de frangos com adição de compostos bioativos e aumento da qualidade da carne

Biotecnologia Vegetal - Graduação

018 BRUNARA EVELY DE ARAUJO LIMA..... 086
Produção de vacinas por meio de plantas transgênicas: Prospecção tecnológica

019 GABRIEL LUCAS PAIL 091
Simulação da digestão biológica in vitro de fibras de amido solúvel de batata carregadas com extrato da casca de pinhão

020 GUSTAVO HENRIQUE CAMOZATTO..... 096
Caracterização de FaTCPs em *Fragaria x ananassa*

021 MILENA TEREZA TORRES DO COUTO..... 101
Otimização dos parâmetros de extração de uma enzima fibrinolítica obtida de uma leguminosa através do sistema de duas fases aquosas

Biotecnologia Vegetal – Pós-graduação

022 CRISTIANE MICHELE ALVES DE OLIVEIRA 105
Produção de membrana barreira para regeneração óssea guiada com zeína

023 ÉLDER PACHECO DA CRUZ..... 111
Atividade antioxidante de extrato da casca de pinhão (sementes de *Araucaria angustifolia*) encapsulado em fibras de amido solúvel de batata

024 ÉLDER PACHECO DA CRUZ..... 116
Fibras de amido solúvel de batata incorporadas com extrato da casca de pinhão (sementes de *Araucaria angustifolia*): atividade antimicrobiana

025 OHANA LUIZA SANTOS DE OLIVEIRA 121
Estudo da citotoxicidade dos extratos de *Passiflora foetida* L. e *Passiflora morifolia* Mast. em linhagens de células tumorais in vitro

026 PRISCILA NISHIZAKI BORBA 126
reaproveitamento de vegetais para extração e caracterização de DNA

Microbiologia – Graduação

027 AMANDA DE OLIVEIRA BARBOSA 130
Detecção e identificação genética de *Alphaherpesvirus equideo* em amostras clínicas de equinos da região sul do Rio Grande do Sul

028 ANA VITÓRIA COSTA 135
Expressão e caracterização de um antígeno recombinante de *Clostridium chauvoei*

029 ANNA CAROLINA BATISTA E SILVA..... 140
Análise da aplicação do uso da oleorresina extraída do gênero copaifera como um agente antibacteriano: uma breve revisão

030 BEATRIZ AIMI ISHIKAME..... 144
Aplicação de probióticos em diferentes matrizes alimentares – Uma breve revisão

031 DANIEL LOSSA ALTMANN 150
Aumento da produção de fenazina-1-ácido-carboxílico em *E. coli*: efeitos da superexpressão dos genes TktA e PpsA

032 DÉBORAH TROTA FARIAS DE ALBERNAZ..... 155
Potencial antimicrobiano do carvacrol in vitro contra *Acinetobacter baumannii* multirresistente

033 DIEGO PERES ÁVILA..... 160
Perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos e sanitizantes em isolados de *Listeria monocytogenes* de origem alimentar

034 JOÃO PAULO DE PAIVA LEMOS 165
Salmonella spp. em alho-poró comercializado em feiras livres no município de Pelotas – RS

035 LAÍS ABREU ANASTÁCIO..... 169
Diversidade genética de isolados de *L. monocytogenes* provenientes de sushis

036 LARIANE DA SILVA BARCELOS 174
Detecção de vírus que acometem *Apis mellifera* em apiários do sul do Brasil

037 LARISSA APARECIDA ALMEIDA DE BRITO 179
Seleção de microrganismos queratinolíticos para utilização em processo fermentativo de hidrólise de resíduos avícolas

038 LAURA MARIA DE ARAÚJO PEREIRA..... 184
Análise ecológica, exploratória e epidêmica do COVID-19 na Paraíba

039 LUIZ GUSTAVO BACH 189
Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* provenientes de surtos de intoxicação estifolocócica

040 MIRIAN ELERT DA SILVA 194
Formação de biofilme pelas bactérias *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*

041 NATHALIA TURKOT CANDIAGO 199

Metodologia de microencapsulação de levedura probiótica *Saccharomyces boulardii* e sua aplicação em petisco pet

042 RAFAELA ANSILIERO 204
Análise do perfil microbiano de pacientes com periodontite

043 RODRIGO YUDI ISHIKAME 208
Efeito antibacteriano de nanopartícula biogênica de prata (Bio-AgNP) frente a *Enterococcus faecalis* e *Klebsiela pneumoniae*

044 TAIRINE DA ROSA RIBEIRO 213
Estabilidade térmica e parâmetros termodinâmicos de xilanases bruta e purificada de *Aureobasidium pullulans*

045 TAMIRES HÜBNER 218
Obtenção de xilo-oligossacarídeos potencialmente prebióticos utilizando xilanase bruta e purificada

046 THAYNÁ LANER CARDOSO 223
Diagnóstico sorológico utilizando a proteína rErpR-like na detecção de anticorpos IgM e IgG anti-*Leptospira* em humanos

047 VANESSA INÁCIA BORGES DE SOUSA 228
Avaliação da atividade antifúngica de curcuminoides durante co-cultivo de *Trichophyton rubrum* em linhagem de macrófago humano THP-1.

Microbiologia – Pós-graduação

048 EDUARDA CAETANO PEIXOTO 233
Coliformes termotolerantes em alho poró comercializado em feiras livres no município de Pelotas – RS

049 FERNANDA WEBER BORDINI 238
Probiótico livre e microencapsulado: morfologia e resistência ao armazenamento em diferentes temperaturas

050 GABRIELE RODRIGUES CONCEIÇÃO 243
Cultivo de microalgas em vinhaça para a biorremediação e produção de bioprodutos

051 GUILHERME DA SILVA MENEGAZZI 248
Encapsulação de probióticos: uma breve revisão sobre as técnicas utilizadas e suas características

052 LUIZ CLAUDIO SIMÕES CORRÊA JUNIOR 253
Purificação de xilanases de *Aureobasidium pullulans* CCT 1261 utilizando precipitação com sulfato de amônio

053 MORGANA LÜDTKE AZEVEDO 258
Extratos aquosos de *Lentinula edodes*, *Pleurotus pulmonaris* e *Pleurotus sajor-caju*: atividade antifúngica e inibição da produção de exoenzima de *Candida albicans*

054 NATHIÉLI BASTOS DE SOUZA 263
Produção de xilo-oligossacarídeos a partir da hidrólise enzimática de xilana bruta e pré-tratada com ultrassom

055 RENAN EUGÊNIO ARAUJO PIRAINE 268
Caracterização do isolado ONP131 de *Moniliella megachiliensis* para produção de cerveja

Multidisciplinar - Graduação

056 BRUNA ABEL PACKOWSKI 273
Suplementação de ácido 3-indolacético em diferentes fases do cultivo de *Spirulina sp.* Leb 18 para aumento da produtividade de biomoléculas

057 BRUNA GOVONI 278
Produção de O-Rings por impressão 3D e testes para utilização na engenharia tecidual

058 BRUNA MIRANDA RODRIQUES 283
Identidade e pertencimento qualificando a formação do biotecnologista

059 EDMILSON CAETANO JUNIOR 287
Fitoquímicos vegetais com potencial Anti-SARS-Cov 2

060 GUILHERME SCHMITT REIDER 292
Aferência de compostos derivados da isoniazida: uma análise da toxicidade *in vitro* e *in silico*

061 LAURA DE VASCONCELOS COSTA 297
Consumo de iogurte e influência de compra: um estudo de mercado

062 NATÁLIA MADRUGA ARRIEIRA 301
Fonte de carbono lipídica na indução da síntese de lipase por *Yarrowia lipolytica*

063 THEODORO DA ROSA SALLES 306
Obtenção de guanina magnética

Multidisciplinar – Pós-graduação

064 BRUNA TRINDADE PAIM 310
Ácidos clorogênicos e sua bioacessibilidade

065 EDUARDO SILVEIRA RIBEIRO 315
Desenvolvimento de fibras através da técnica de electrospinning: efeitos dos parâmetros operacionais e físico-químicos

066 TAMARA DOS SANTOS MACHADO 320

Síntese, caracterização e estudos computacionais empregando DFT em complexos de Cu(II) contendo ligantes tridentados fenolato-imina com grupo pendente N-,S- e O-

Saúde Humana – Graduação

067 AIRTON SINOTT 325
Efeitos de um composto orgânico de selênio no modelo da privação do sono em camundongos

068 DANIELLE TAPIA BUENO 330
Síntese e avaliação da atividade antioxidante de novos complexos de Cobre (II) contendo ligantes bases de Shiff

069 DIANER NORNBERG STRELOW 335

Investigação da ação do tipo antidepressiva e de paramêtros de toxicidade sistêmica em camundongos fêmeas expostos à administração aguda de 2-fenil-3-(fenilselanil)benzofurano

070 EVELYN MIANES BESCKOW 340
O envolvimento dos receptores dopaminérgicos D2/3 no efeito do tipo antidepressivo da benzamida n-(3-(fenilselenil)prop-2-in-1-ílica (SePB) em camundongos

071 FRANCIANE BATISTA NUNES 345
Rápida e fácil obtenção da nanocelulose bacteriana magnética

072 FRANCIELE DA SILVA BRUCKMANN 350
Rápida e fácil obtenção de eugenol com propriedades magnéticas

073 FRANCIELI DA SILVA DOS SANTOS 355
Ácido tânico: um composto fenólico com ação antiglioma e ansiolítica em modelo animal de glioblastoma

074 GIULIANA PETIZ ZUGNO..... 360
Avaliação in vitro da capacidade antioxidante de compostos híbridos moleculares da betacalcogenamina di-terc-butilfenólico

075 GUSTAVO D'AVILA NUNES..... 365
Envolvimento dos receptores serotoninérgicos 5-HT2A/2C no efeito antinociceptivo de uma benzamida selenopropargílica no teste de imersão da cauda em camundongos

076 JULIANE TORCHELSEN SARAIVA..... 370
Comparação entre o efeito citotóxico do ácido tânico e ácido gálico frente à linhagem de glioblastoma de rato

077 KELEN GOULARTE..... 375
Efeitos da inosina no status redox cerebral de ratos em um modelo de déficit de aquisição de memória induzido por escopolamina

078 LARISSA MENEZES DA SILVEIRA..... 380
Efeito citotóxico seletivo do extrato de mirtilo em linhagem de glioblastoma C6

079 LETÍCIA DEVANTIER KRÜGER..... 385
Avaliação da toxicidade aguda e do possível envolvimento dos receptores β-adrenérgicos no efeito do tipo antidepressivo do composto 2-fenil-3-(fenilselanil)benzofurano em camundongos Swiss machos

080 LUIZA BLOTA CORRÊA..... 390
7-cloro-4-(fenilselanil)quinolina reverte o comportamento depressivo induzido pelo estresse agudo de contenção em camundongos

081 MARIA CAROLINA ALVES DA SILVA..... 395
Síndrome de Cowden: uma análise da produção científica em bancos de dados nacionais e internacionais

082 MILENA TEREZA TORRES DO COUTO..... 400
Influência do pH e temperatura sobre a atividade proteásica de uma serino protease livre e imobilizada em nanopartículas magnéticas

083 RAPHAELA CASSOL PICCOLI 405
Efeito do extrato de *Psidium cattleianum* no perfil lipídico em modelo animal de síndrome metabólica

084 SARA KESKE 410
Efeito do extrato de mirtilo no comportamento tipo-depressivo e nos níveis do TNF-α em camundongos submetidos a um modelo de depressão

085 SOLANGE VEGA CUSTÓDIO 415
Extrato de mirtilo previne alterações comportamentais e bioquímicas séricas em camundongos submetidos a um modelo comportamental do tipo-depressivo induzido por lipopolissacarídeo

086 TAYNÁ AMARAL VELEDA 420
Efeito de *Rubus sp.* sobre níveis de espécies reativas de oxigênio, lipoperoxidação e atividade da catalase em estriado de animais submetidos ao modelo de Diabetes tipo 2

087 VANESSA MARIA ANDRADE MACHADO MIRANDA 425
Avaliação de uma serino protease com atividade fibrinolítica sobre os tempos de coagulação sanguínea

Saúde Humana – Pós-graduação

088 BERNARDO DE MORAES MEINE 430
Ácido tânico protege contra os danos oxidativos renais causados pela hipermetioninemia aguda

089 BERNARDO DE MORAES MEINE 2 435
Novas abordagens terapêuticas em aminoacidopatias

090 BRUNA ALINE MICHELOTTO CANTELLI 440
Quantificação das interleucinas IL-1-β e IL-17E durante o co-cultivo de macrófago THP-1 com *Trichophyton rubrum* simulando uma infecção sistêmica

091 EMILLI KARINE MARCOMINI 445
Aloe Vera e sua potencialidade como cicatrizante

092 EMILLI KARINE MARCOMINI 2 450
Kombucha para saúde humana: um probiótico efetivo?

093 FERNANDA CARDOSO TEIXEIRA 454
Inosina previne déficits na consolidação da memória e alterações na atividade da Na^+K^+ATPase em ratos submetidos a um modelo animal de amnésia induzido por escopolamina

094 KARINA PEREIRA LUDUVICO 459
Redução dos níveis de marcador inflamatório TNF-α e modulação da enzima Na^+, K^+-ATPase como mecanismos antidepressivos do ácido tânico

095 LUIZA SPOHR 464
Extrato de mirtilo previne comportamento tipo-depressivo e atenua o estresse oxidativo em córtex cerebral induzido pelo lipopolissacarídeo em camundongos

096 MARIA CLARA MARTINS FERREIRA 469
Identificação de proteínas com potencial de interação com Siglec1 após a ligação ao HIV-1 em células dendríticas

097 TAÍS DA SILVA TEIXEIRA RECH 474
Avaliação do envolvimento da via dopaminérgica no efeito do tipo antidepressivo do composto 2-fenil-3-(fenilselanil)benzofurano em camundongos

Ensino e Extensão - Graduação

098 AIRTON SINOTT 479
Talk Science At Home: divulgação remota da ciência e da biotecnologia

099 ALINE DO AMARAL 484
Serviço de Oncologia Veterinário da Universidade Federal de Pelotas (SOVET-UFPEL)

100 ANA CLAUDIA OLIVEIRA DE FREITAS 489
Talk Science At Home: dos pubs para internet

101 CAIO MAURÍCIO AMADO 494
Procedimento operacional padrão para clivagem de amostras de tecido cutâneo

102 DAVI BÄRWALDT DUTRA 499
Microverdes

103 MARINA GIODA NORONHA 504
Procedimento operacional padrão para clivagem de tumores mamários

104 THAYANNE THYSSYANNE DE SOUZA SOARES COSTA 509
Divulgação científica e sua importância: uma breve revisão.

105 WELLINGTON DA SILVA 514
Medicina veterinária e biotérios: indispensáveis à ciência

Análises estruturais de lectinas de *Musa acuminata* de diferentes espécies através de ferramentas bioinformáticas

ANA CLAUDIA OLIVEIRA DE FREITAS[1]; ALESSANDRA NEIS[2] MABELLE CARDIA NUNES DOS SANTOS[3]; RAFAEL WOLOSKI DOS SANTOS[4] LUCIANO DA SILVA PINTO

[1]Universidade Federal de Pelotas – anaclaudia.olvf@outlook.com
[2]Universidade Federal de Pelotas – alessandraneisbiotec@gmail.com
[3]Universidade Federal de Pelotas – mabellecardia@hotmail.com
[4] Universidade Federal de Pelotas – rafaelwoloski@gmail.com
[4]Universidade Federal de Pelotas – ls_pinto@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Lectinas são um grupo de proteínas de origem não imune que se ligam reversivelmente a diversos tipos de carboidratos. A importância do estudo das lectinas reside em seu amplo potencial de aplicação. As lectinas do gênero *Musa* spp. já apresentaram atividade imunomoduladora, antifúngica, antiproliferativa e antiviral inclusive sobre o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (SINGH; DEVI; NG, 2014).

O gênero *Musa* pertence à família *Musaceae*, suas espécies selvagens são divididas em: *eumusa*, *rhodochlamys*, *australimusa. A*inda, existem diferentes espécies, como: *Musa acuminata*, *Musa balbisiana*, *Musa schizocarpa* e algumas variedades de *australiana* (DAVEY *et al.*, 2013).

As lectinas apresentam grande diversidade estrutural e de especificidade, o que está relacionado à sua ampla gama de atividades biológicas (DAMME *et al.*, 1998). Por outro lado, existem domínios altamente conservados de reconhecimento de carboidratos (CDR) - sítios de ligação específica entre a proteína e um ligante, que fornecem informações funcionais essenciais. Atualmente, a maioria dos estudos se concentra na lectina de *Musa acuminata,* mais conhecida como BanLec (KENNEDY *et al.*, 1995). No entanto, o gênero *Musa* engloba diferentes espécies que são pouco estudadas, assim, com o advento das ferramentas de bioinformática, o processamento de dados apresentou um crescimento exponencial na quantidade e sequências em bancos de dados e possibilitou obter estruturas tridimensionais para análises de arranjos

conformacionais, que auxiliam na elucidação dos aspectos funcionais que permeiam sua atividade (CHEN, 2015).

Tendo em vista a falta de informações estruturais para a maioria das lectinas do gênero *Musa* e o impacto de diferentes aminoácidos sobre os sítios de ligação a carboidratos, o objetivo deste estudo é modelar e analisar a estrutura de lectinas de diferentes espécies do gênero Musa, uma vez que modificações nestes sítios podem levar à diferentes atividades biológicas.

2. METODOLOGIA

A fim de encontrar as lectinas do gênero Musa, utilizamos a ferramenta de BLAST para realizar o alinhamento local (BLASTp) das sequências de lectina de *Musa acuminata* (AAM48480.1), obtidas do banco de dados do NCBI, dentro dos seguintes parâmetros: *database* proteínas não redundantes (nr) e a limitante de organismos pertencentes à família *Musaceae* (ALTSCHUL *et al.*, 1990). Utilizamos a ferramenta CLUSTAL para o alinhamento global das sequências que apresentaram as maiores identidades no passo anterior e identificar as semelhanças e diferenças entre elas (HIGGINS, 1994).

No UNIPROT (APWEILER, 2004), obtivemos os dados de sítios de ligação a carboidratos para análise de possíveis modificações. Três lectinas que apresentaram diferenças nestes domínios foram modeladas por homologia através do software SWISS-MODEL (PEITSCH, 1997). Estas estruturas foram visualizadas no Pymol Molecular Graphics (version 2.0, Schrödinger) e alinhadas às estruturas de referência, já detectadas experimentalmente. A sequência de *Musa acuminata* (PDBID: 1X1V) foi utilizada como base para verificar os sítios de ligação à manose no alinhamento.

Realizamos o *docking* molecular com moléculas de manose e glicose nos sítios de ligação a carboidrato (33-38, 60-63, 105-106, 130-133) através do AutoDock Vina (TROTT; OLSON, 2009), que permite obter a energia de ligação (medida de afinidade) entre uma molécula e seu ligante, assim como a melhor conformação do ligante. No software PLIP (SALENTIN *et al.*, 2015), confirmamos se a ligação se deu com os resíduos de aminoácidos corretos e qual a interação química que se formou, onde esperamos a ocorrência de ligações de hidrogênio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a literatura, não há registros que demonstram que essas estruturas tenham sido previamente modeladas. Neste estudo, trazemos as primeiras estruturas tridimensionais das lectinas THU46913.1 (*Musa balbisiana*), RWW21725.1 *(Ensete ventricosm*) e XP_018673707.1 (*Musa acuminata* subsp. malaccensis). Na ferramenta BLASTp a partir do alinhamento local de cada uma das moléculas, foram selecionadas as proteínas que apresentaram a maior identidade comparada a nossa sequência de *Musa acuminata*. (PDBID: 1X1V). As lectinas selecionadas de cada espécie apresentaram 100% de cobertura e identidade com THU46913.1 (96%), RWW21725.1 (89%) e XP_018673707.1 (95%). Na análise de conservação global das sequências usando o software CLUSTAL, observou-se que as mesmas apresentam uma alta similaridade (cerca de 95%) e diferenças marcantes nos sítios ativos de ligação aos carboidratos.

O software SWISS-MODEL foi utilizado com o propósito de avaliar de forma estrutural o impacto da troca dos aminoácidos nos sítios ativos. As estruturas modeladas apresentaram uma boa qualidade de modelagem, conforme os valores obtidos para o QMEAN (Tabela 1). Além disso, as três utilizaram como *template* a molécula 4pif do banco de dados PDB, e, quando alinhadas, apresentaram valor RMSD próximo de zero, indicando que possuem pouquíssimas diferenças estruturais.

Tabela 1. Resultados obtidos com o software SWISS-MODEL

Sequências	QMEAN	QMGE	Identidade (%)	PDB ID	Energia de ligação (média – kcal/mol)
THU46913.1	2,25	0,98	94,33	4PIF	-4,35
RWW21725.1	2,3	0,96	87,94	4PIF	-4,32
XP_018673707.1	2,58	0,99	94,33	4PIF	-4,31

O *docking* molecular revelou que as estruturas THU46913.1, RWW21725.1 e XP_018673707.1 não demonstraram significativas modificações na ligação com a manose, o que ainda deve ser comprovado experimentalmente. Apesar das energias de ligação (kcal/mol) terem um valor baixo (total médio de –4.35), os aminoácidos dos sítios de ligação a carboidratos estavam interagindo com o ligante por ligações de hidrogênio, o que está de acordo com as estruturas

de referência do PDB (PDBID: 1X1V) e também, podemos observar que a energia não diferiu entre as moléculas que apresentaram diferentes aminoácidos nos sírios de ligação. Estes resultados indicam que provavelmente sua função não é modificada de forma significativa e comprovando sua capacidade de interagir com a manose, característica de lectinas como as de feijão de porco (ConBr) e concavalina (ConA).

4. CONCLUSÕES

Através das nossas análises é possível verificar que essas lectinas de *Musa* spp. avaliadas mantém o potencial de se ligar a manose, nos mesmos sítios que a Banlec (*Musa acuminata*). Portanto, são necessários mais estudos acerca da sua atividade biológica e estrutural dessas moléculas, pois podem apresentam ações de grande interesse comercial

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, Stephen F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, *[S. l.]*, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2. Acesso em: 15 ago. 2020.

CHEN, Runsheng. On bioinformatic resources. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, *[S. l.]*, v. 13, n. 1, p. 1–3, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.02.002. Acesso em: 15 ago. 2020.

HIGGINS, D. G. CLUSTAL V: multiple alignment of DNA and protein sequences. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, *[S. l.]*, v. 25, p. 307–318, 1994. Disponível em: https://doi.org/10.1385/0-89603-276-0:307. Acesso em: 15 ago. 2020.

PEITSCH, M. C. Large scale protein modelling and model repository. **Proceedings. International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology**, *[S. l.]*, v. 5, p. 234–236, 1997. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9322042. Acesso em: 15 ago. 2020.

KENNEDY, J. F. *et al.* **Lectins, versatile proteins of recognition: a review**. *[S. l.]*: Elsevier, 1995. Disponível em: https://doi.org/10.1016/0144-8617(94)00091-7

SINGH, Senjam Sunil; DEVI, Sanjenbam Kunjeshwori; NG, Tzi Bun. **Banana lectin: A brief review**. *[S. l.]*: MDPI AG, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.3390/molecules191118817

DAVEY, Mark W. *et al.* " A draft Musa balbisiana genome sequence for molecular genetics in polyploid, inter- and intra-specific Musa hybrids". **BMC Genomics**, *[S. l.]*, v. 14, n. 1, p. 683, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-683. Acesso em: 26 maio. 2020.

DAMME, Els J. M. Van *et al.* Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, *[S. l.]*, v. 17, n. 6, p. 575–692, 1998. Disponível em: https://doi.org/10.1080/07352689891304276

Lectina de *Musa acuminata* NCBI

BLASTp

Seleção de 3 sequências

CLUSTAL

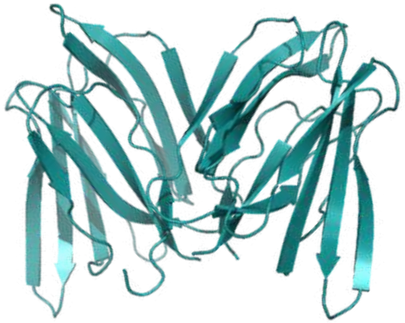
SWISS-MODEL



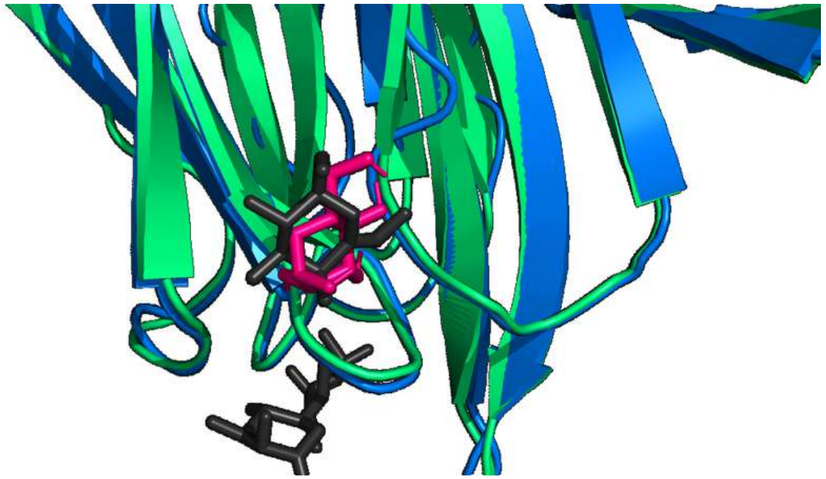
RWW21725.1



THU46913.1



XP_018673707.1



Docking molecular



ESTUDOS FARMACOCINÉTICOS E TOXICOLÓGICOS *IN SILICO* DE DERIVADOS PIRAZOL-ORGANOCALCOGÊNIOS

IANKA JACONDINO NUNES[1]; DANIELLE TAPIA BUENO[2]; TAMARA SANTOS[2]; THALITA AQUINO[2]; DANIELA HARTWIG[2]; ADRIANA CASTRO PINHEIRO[3]

[1]Universidade Federal de Pelotas – iankajacondinonunes@gmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas – dani.hartwig@gmail.com
[3]Universidade Federal de Pelotas – adrianacastropinheiro@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A sobrevivência e crescimento da indústria farmacêutica requerem investimentos significativos em Pesquisa e Desenvolvimento, em novas formulações químicas, que possam atuar como fármacos com elevada eficácia e seletividade. Entretanto esse processo é custoso, demanda tempo, além de ser altamente arriscado, visto que a probabilidade de sucesso é inferior a 20% (YU YU & GITTINS, 2008).

Sendo assim, para minimizar tempo e custos, inovações científicas e tecnológicas que combinam conhecimentos multidisciplinares de informática, biotecnologia, química e biologia (DREWS, 2003) surgem como ferramentas que auxiliam no planejamento de novos fármacos. O planejamento de fármacos auxiliado por computador (Computer-Aided Drug Design) é uma dessas evoluções tecnológicas promissoras (TANG *et al*., 2006), visto que a modelagem molecular possibilita a construção, visualização, manipulação e estocagem de modelos moleculares tridimensionais, incluindo também análise conformacional, cálculos de propriedades estéricas, eletrônicas, físicas entre outras.

Outra estratégia que pode reduzir o tempo gasto em pesquisa e desenvolvimento de um novo fármaco é a realização de estudos farmacocinéticos e toxicológicos. A predição *in silico* de parâmetros ADMET permite uma avaliação do perfil farmacocinético e toxicológico esperado para candidatos a protótipos a fármacos, consistindo num método alternativo para auxiliar na seleção do protótipo de melhor perfil farmacoterapêutico.

A farmacocinética *in silico* é uma abordagem atualmente muito utilizada no estudo inicial das propriedades ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade) cujo objetivo é limitar o gasto desnecessário em ensaios biológicos de compostos com alta probabilidade de problemas farmacocinéticos e tóxicos futuros, economizando tempo e investimento (LIPINSKI, 2004). A confiabilidade nestes modelos teóricos é dependente de informações de banco de dados proprietários e que estão sendo gradualmente liberados pelas indústrias farmacêuticas. Estes modelos também são submetidos à testes de desafio, onde o objetivo é determinar o grau de confiança no mesmo (WANG *et al*, 2007).

Neste estudo, apresentamos diferentes análises realizadas com compostos derivados de pirazol-organocalcogênios, com o objetivo de realizar um levantamento quanto a suas características farmacocinéticas e toxicológicas com o auxílio de ferramentas *in silico*. Para isso, foram utilizados dois softwares: Osiris Property Explorer e SwissADME.

2. METODOLOGIA

2.1. Análise de dados: Todas as análises *in silico* foram realizadas em um computador, especificamente com o sistema operacional Windows 10 e processador Intel® Inside™.

2.2. Análises *in silico*: Diferentes análises foram feitas com os compostos alvo, a fim de realizar um levantamento teórico quanto a suas características farmacocinéticas, farmacodinâmicas e toxicológicas. Para isso, foram utilizados dois softwares: Osiris Property Explorer e SwissADME.

2.3. Osiris Property Explorer: O programa *Osiris Property Explorer* da *Actelion Pharmaceuticals* é um programa de acesso gratuito pela Internet, que permite desenhar estruturas químicas em duas dimensões e estimar, com bom grau de confiabilidade, algumas propriedades físico-químicas, biológicas e *drug-like* (KAPETANOVIC, 2008) relevantes no planejamento de novos fármacos. Este programa está fundamentado no uso de uma lista de fragmentos distintos, gerados a partir da quebra das ligações simples das moléculas, que estão associados a uma classificação de similaridade a fármacos (*drug-likeness*).

A partir do programa Osiris *Property Explor*, são obtidos dados relacionados ao risco de mutagenicidade, tumorigênico, irritantação e efeitos no sistema reprodutor, além de buscar semelhança com fármacos e índice de aproximação para se tornar um potencial candidato a fármaco. O risco de toxicidade é baseado no banco de dados de substâncias químicas que possuem comprovadamente efeito tóxico (Registry of Toxic Effects of Chemical Substances - RTECS) e validado com um banco de dados contendo fármacos comercialmente disponíveis e largamente usado no mercado.

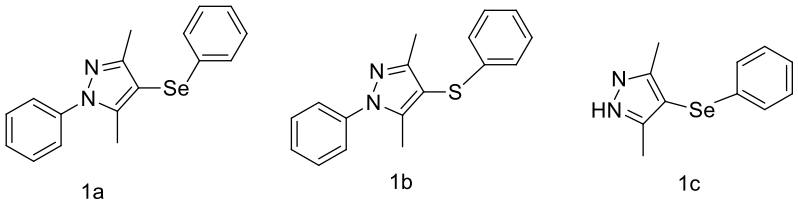
2.4. Swiss ADME: A ferramenta web SwissADME dispõe de acesso gratuito a uma gama de modelos preditivos, para propriedades físico-químicas, parâmetros ADME, propriedades farmacocinéticas e similaridade com fármacos aprovados comercialmente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os compostos 4-(arilcalcogenil)-1H-pirazóis (Figura 1) foram sintetizados seguindo procedimentos descritos na literatura (OLIVEIRA et al., 2015). Esses compostos orgânicos apresentam interessantes atividades biológicas, tais como antioxidantes e anti-inflamatórias (Oliveira et. Al., 2020). Ainda, estudos *in vitro,* investigando a citotoxicidade destes compostos em células normais e cancerígenas estão em andamento.

Para a predição da toxicidade e propriedades farmacocinéticas dos pirazol-organocalcogênios (1a-1c), realizou-se um estudo *in silico,* o qual posteriormente será comparado com resultados toxicológicos *in vivo.* Foram obtidos dados relacionados ao risco de toxicidade (mutagênico, tumorigênico, irritante e efeitos no sistema reprodutor), "*druglikeness*" (semelhança com fármacos) e "*drugscore*" (índice de aproximação para se tornar um potencial candidato a fármaco).

Utilizando a ferramenta Osiris Property Explorer (Tabela 1), verificou-se que os compostos 1a – 1c apresentam ausência de fragmentos estruturais indicadores de risco, resultando em uma baixa probabilidade de os mesmos apresentarem efeitos tóxicos para os parâmetros analisados.



1a 1b 1c

Figura 1. Estruturas químicas escolhidas para avaliação farmacocinética e toxicológico *in silico*. (OLIVEIRA et al., 2015)

O *Drug-Score* combina os valores obtidos de *Drug-Likeness*, cLogP (lipofilicidade), logS (solubilidade), massa molecular e riscos toxicológicos em um único valor de modo a avaliar se o composto tem potencial para se tornar um fármaco. Nesse parâmetro valores mais próximos de 1 (um) indicam um bom perfil *Drug-Score.* Analisando os valores de *Drug-score* presente na (Tabela 1) a molécula que apresenta um potencial farmacológico melhor é 1b, contendo enxofre em sua estrutura.

Tabela 1. Estudos toxicológicos e farmacocinéticos empregando Osiris Property Explorer.

Parâmetros avaliados	1a	1b	1c
Mutagênico	Não	Não	Não
Tumorogênico	Não	Não	Não
Irritante	Não	Não	Não
Efeitos no sistema reprodutor	Não	Não	Não
Druglikeness	-1,99	2,71	-3,7
Drug-score	0,42	0,75	0,46

Os estudos com o software SwissADME (Tabela 2) demonstram que o composto 1b pode inibir CYP450 CYP2C19, CYP2C9 e CYP3A4, ocasionando diminuição do metabolismo de fármacos metabolizados por essas isoformas do citocromo P450. A absorção gastrointestinal se mostrou alta para os três compostos analisados.

Os resultados teóricos indicam que os compostos 1a-1c apresentam potencial para penetrar a barreira hematoencefálica (BHE). Ainda, o composto 1a inibe a glicoproteína-P, sendo esta uma importante proteína que está envolvida no transporte do fluxo de fármacos e xenobióticos. Os três compostos possuem baixa absorção na pele, além de possuírem LogP<5, o que se enquadra na categoria de fármacos aprovados.

A lipofilicidade de uma molécula é uma das propriedades mais importantes no processo farmacocinético, sendo considerada nos estudos de absorção intestinal, permeabilidade da membrana, ligação a proteínas e distribuição em diferentes tecidos. Esse descritor é definido, geralmente, pelo coeficiente de partição (P) de um composto entre 1-octanol e água, sendo expresso na forma logarítmica, i.e., LogP (RAEVSKY,2004).

Tabela 2. Estudo farmacocinético empregando SwissADME.

Parâmetros avaliados	1a	1b	1c
CYP1A2-Inibição	Não	Sim	Não
CYP2C19-Inibição	Não	Sim	Não
CYP2C9-Inibição	Não	Sim	Não

CYP2D6-Inibição	Sim	Sim	Não
CYP3A4-Inibição	Sim	Sim	Não
Absorção Gastrointestinal	Alta	Alta	Alta
Glicoproteina-P - Inibição	Sim	Não	Não
Permeabilidade na pele (cm/s)	-5,23	-4,47	-5,96
Penetração na BHE	Sim	Sim	Sim
LogP	2,62	4,24	1,57

4. CONCLUSÕES

No presente trabalho empregamos estudos *in silico* para avaliar a arquitetura molecular de três compostos derivados de pirazol-organocalcogênio.

A partir do programa Osiris, foi possível realizar a previsão teórica do perfil de toxicidade desses compostos, podendo-se observar que os três compostos analisados não possuem toxicidade aparente, além disso auxilia a atividade significativa dos compostos 1a-1c. Este resultado teórico, reforçada pelo ensaio experimental de toxicidade *in vivo*, confirma que estes derivados possuem baixo perfil de toxicidade.

Avaliando os resultados encontrados no programa SwissADME podemos concluir que devem ser feitos maiores estudos sobre a as suas interações com as CYP, evitando assim futuros problemas no metabolismo de fármacos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

OLIVEIRA, D.; AQUINO, T.; EDMILSON, J.; PERIN, G.; JACOB, R.; ALVESA, D. Direct Synthesis of 4-Organylselanylpyrazoles by CopperCatalyzed One-Pot Cyclocondensation and C-H Bond Selenylation Reactions. **Advanced Synthesis and Catalysis**, Brasil, v. 357, p. 4041-4049, 2015.

YU YU J.&, GITTINS J., Models and software for improving the profitability of pharmaceutical research**, *European Journal of Operational Research, v.*** 189 p. 459– 475, 2008.

TANG Y.,ZHU W., CHEN K., JIANG H. New technologies in computer-aided drug design: Toward target identification and new chemical entity discovery. ***Drug Discovery Today: Technologies****, Medicinal chemistry v.*3 (3): p. 307-313, 2006.

LIPINSKI, C.A. - Lead and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. ***Drug Discovery Today: Technologies***, v. 1, p. 337-341, 2004.

WANG, J.; KRUDY, G.; HOU, T.; ZHANG, W.; HOLLAND, G.; XU, X. – Development of Reliable Aqueous Solubility Models and Their Application in Druglike Analysis, ***J. Chem. Inf. Model*****,** v. 47, p. 1395-1404, 2007.

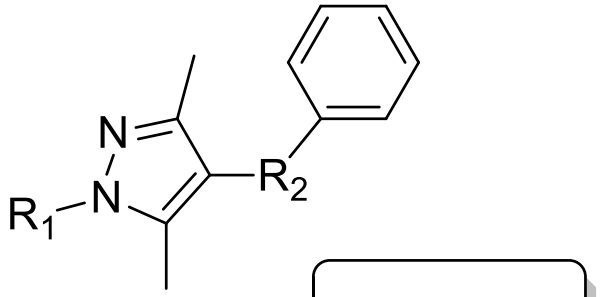
RAEVSKY, O.A.; Physicochemical Descriptors in Property-Based Drug Design, ***Mini Rev. Med. Chem****.*, v. *4*, p. 1041-1052, 2004.

OLIVEIRA, D.; SOUSA, F.; BIRMANN P; PESARICO, A.; ALVES, D.; GUIMARÃES, R.; SAVEGNAGO, L.; Evaluation of antioxidant activity and toxicity of sulfur- or selenium-containing 4-(arylchalcogenyl)-1H-pyrazoles. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** V. 98, p. 441–448, 2020.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

ESTUDOS FARMACOCINÉTICOS E TOXICOLÓGICOS *IN SILICO* DE DERIVADOS PIRAZOL-ORGANOCALCOGÊNIOS

IANKA JACONDINO NUNES[1]; DANIELLE TAPIA BUENO[2]; TAMARA SANTOS[2]; THALITA AQUINO[2]; DANIELA HARTWIG[2]; ADRIANA CASTRO PINHEIRO[3]



R1 = Ph, H
R2 = S, Se

Análises *in silico*:

- Farmacocinéticas
- Farmacodinâmicas
- Toxicológicas

ANÁLISE DE GENES CANDIDATOS A REGULADORES DA DETERMINAÇÃO DE CASTAS EM ABELHAS

IZABELLA CRISTINA SILVA[1]; MÁRCIO JOSÉ DOS SANTOS FILHO[1]; FLÁVIA CRISTINA DE PAULA FREITAS[1]

[1] Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Minas Gerais – izabella.silva@sou.unifal-mg.edu.br, marcio.filho@sou.unifal-mg.edu.br, flaviacpfreitas@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As abelhas sem ferrão (Meliponini) são espécies altamente eussociais e constituem um grupo irmão de Apini (abelhas melíferas) (MICHENER, 2007). Uma diferença marcante entre as abelhas sem ferrão e as abelhas melíferas é a forma como ocorre a determinação das castas femininas. Este mecanismo em *Apis mellifera* resulta da quantidade e qualidade de alimento: as rainhas recebem geleia real durante todo o desenvolvimento larval enquanto as operárias recebem geleia real apenas até o terceiro estágio larval (L3) e então são nutridas com geleia de operária (composta de mel, pólen e geleia real) (informações revisadas em Winston, 2003). Nas abelhas sem ferrão do gênero *Frieseomelitta* a determinação de abelhas rainhas e operárias está relacionada apenas à quantidade de alimento ingerido pelas larvas (FAUSTINO et al., 2002; MICHENER, 2007; TEIXEIRA, 2007). As larvas destinadas a se tornarem rainhas se alimentam do dobro de alimento que uma operária em potencial. Na ausência de uma rainha, as operárias constroem uma célula adjacente a outra que tenha uma larva em fase final de alimentação contendo apenas alimento. Dessa forma, as larvas que se desenvolverão em rainhas invadem a célula adjacente e comem o alimento que foi ali depositado(FAUSTINO et al., 2002; TEIXEIRA, 2007).

O período de mudança nutricional em *A. mellifera* é acompanhado por alterações na regulação da expressão de mais de 200 genes entre rainhas e operárias (BARCHUK et al., 2007). Com base nesta análise, foi proposto um modelo de diferenciação de castas em *A. mellifera*. Em rainhas ocorre a ativação da via de insulina através da ingestão da geleia real, que desencadeia o desenvolvimento de caracteres específicos de rainha, como a presença de muitos ovaríolos. Nas operárias, a geleia de operária gera uma menor expressão dos genes da via de Insulina, resultando, portanto, em menor crescimento corporal e ainda o desenvolvimento de caracteres específicos de operárias, como o desenvolvimento das corbículas. Além disso, o produto do gene *epidermal growth factor receptor* (*egfr*) é um fator importante na diferenciação de castas em abelhas (KAMAKURA, 2011) e está intimamente ligado ao processo reprodutivo de *A. mellifera*.

Neste contexto, este trabalho testou a hipótese de que, embora os mecanismos iniciais de determinação de castas possam ser distintos, os genes que atuam na via de diferenciação das castas em abelhas melíferas e abelhas sem ferrão são os mesmos. Para testar esta hipótese, este trabalho avaliou o grau de conservação dos genes *insulin-like peptide 1* (*ilp1*), *insulin-like peptide* 2 (ilp2), *insulin-like peptide receptor 1* (*inr1*), *insulin-like receptor-like* (*inr2*), *epidermal growth factor receptor* (*egfr*), *spitz* (*spi*), *vitellogenin* (*vg*), candidatos a reguladores da determinação de castas em *A. mellifera*, *Frieseomelitta varia* e *Melipona quadrifasciata*. Encontramos as sequências das proteínas

codificadas por estes genes em cada espécie, descobrimos que não só as sequências, mas também as estruturas desses genes no genoma são conservadas. Em seguida, explorou-se o potencial destes genes serem marcadores das castas femininas da espécie *A. mellifera* pela análise do transcriptoma da cabeça de operárias e rainhas. Esta abordagem também permitiu a identificação de outros genes com potencial para marcadores das castas de abelhas. Nosso próximo passo será testar a expressão destes genes em tecidos das abelhas sem ferrão para testar nossa hipótese de conservação das vias de diferenciação de castas nas abelhas melíferas e sem ferrão.

2. MÉTODOS

Buscamos pelos genes candidatos a reguladores da determinação de castas *ilp1, ilp2, inr-1, inR-2, egfr, spitz e vitellogenin* de *A. mellifera* no genoma das espécies *F. varia* e *M. quadrifasciata*. Nesta etapa, utilizamos o algoritmo *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST – Ferramenta Básica de Busca de Alinhamento Local) (ALTSCHUL et al., 1990; PRIYAM et al., 2019), que identifica regiões de similaridade entre sequências. A sequência de aminoácidos das proteínas de *A. mellifera* foram alinhadas contra a base de proteínas preditas para *F. varia* e *M. quadrifasciata*.

Em seguida, a estrutura destes genes foi anotada utilizando plataforma Artemis (BERRIMAN; RUTHERFORD, 2003; RUTHERFORD et al., 2000) nas três espécies. Utilizamos o *Multiplique Sequence Alignment* do *EMBL-EBI* (MADEIRA et al., 2019) e o banco de dados *Conserved Domain Database* (CDD) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (MARCHLER-BAUER et al., 2017) para identificação de domínios conservados nas proteínas de interesse. Em seguida, calculamos a porcentagem de similaridade entre os domínios das diferentes espécies com a ferramenta *online Sequence Identity And Similarity (http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html).*

Foi feita ainda uma análise do transcriptoma da cabeça de rainhas acasaladas e operárias nutrizes a partir de dados recuperados da base pública de dados *Sequence Read Archive* (SRA, do NCBI) (Bioproject PRJNA533756). Para esta análise foram utilizados os seguintes programas: FASTQC (Andrews 2010) para análise de qualidade e detecção de adaptadores, *Tophat* (KIM; SALZBERG, 2011) para alinhamento de sequências no genoma, *HTSeq-count* (ANDERS; PYL; HUBER, 2015) para contagem de leituras de cada gene e *Cufflinks* (TRAPNELL et al., 2010, 2013) para normalização dos dados e identificação dos genes diferencialmente expressos (p-valor ajustado < 0.05).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observamos um alto grau de conservação na estrutura dos genes e na sequência dos domínios dos genes *ilp1, ilp2, inr-1, inR-2, egfr, spitz e vitellogenin* nas três espécies estudadas, *A. mellifera*, *F. varia* e *M. quadrifasciata* (Figura 1, a e b). Desta forma, a caracterização dos genes da via Insulina e EGFR nas abelhas melíferas e sem ferrão nos permitiu identificar a presença destes candidatos a marcadores de castas de *A. mellifera* no genoma das espécies *F. varia* e *M. quadrifasciata*.

Com a análise do transcriptoma da cabeça de operárias e rainhas de *A. mellifera* verificamos se os genes candidatos estavam diferencialmente expressos nas castas. dentre os genes candidatos, apenas o gene *vitellogenin* obteve expressão diferencial significativa, sendo mais expresso em rainha.

Esta análise em larga escala permitiu a identificação de outros candidatos a marcadores das castas femininas nos tecidos presentes na cabeça de operárias e rainhas (Figura 2).

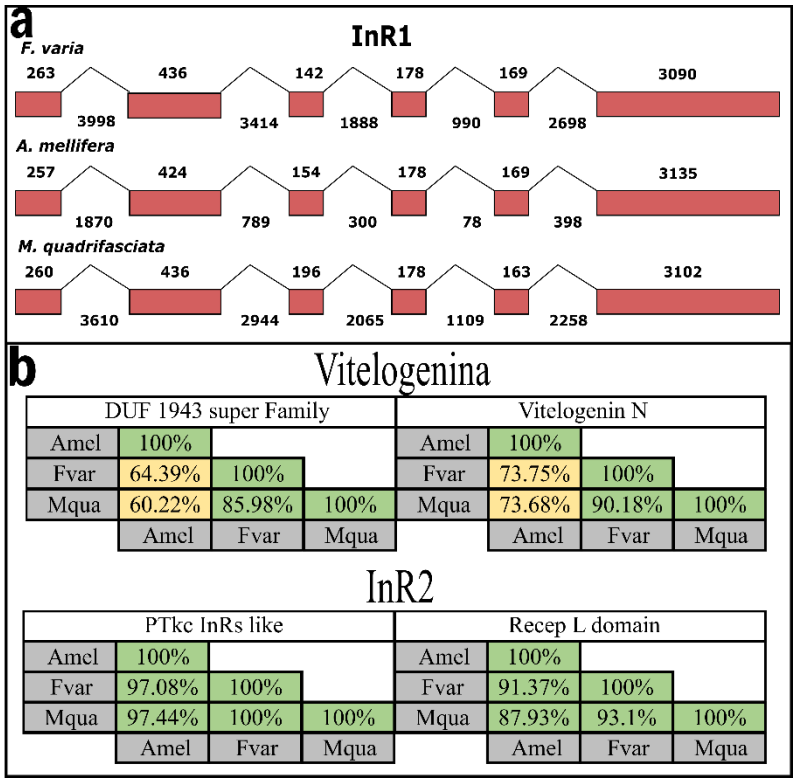


Figura 1. Análise de conservação dos genes. a) Estruturas do gene *inr1* em *F.varia*, *A. mellifera* e *M.quadrifasciata*. b) Análise de similaridade de domínios encontrados nos genes *vitellogenin* e *inr2*, de modo que *Amel* se refere a *A. mellifera*, *Fvar*, *F. varia* e *Mqua*, *M. quadrifasciata*. Fonte: Da autora.

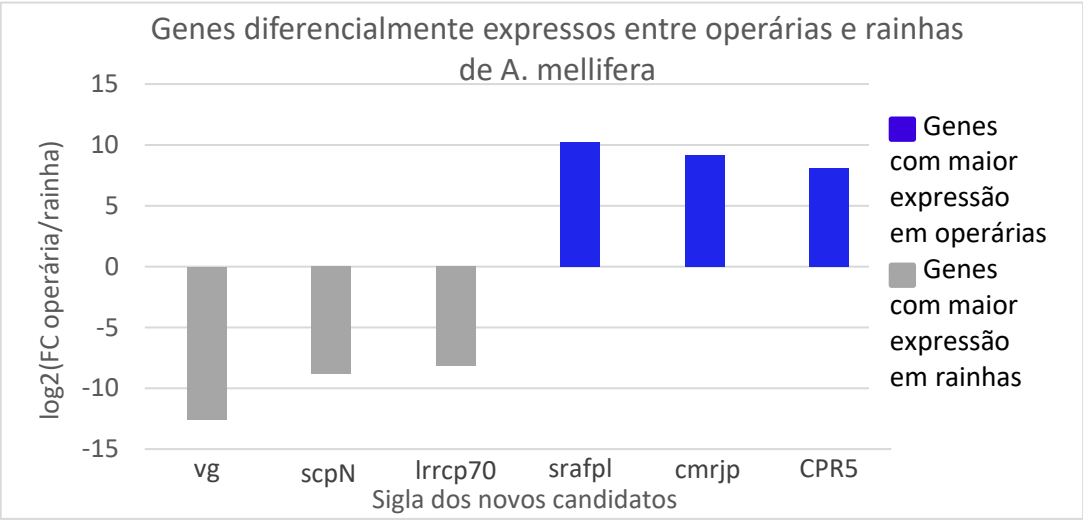


Figura 2. Genes com maior expressão diferencial entre operárias e rainhas na cabeça de *A. mellifera*. As siglas se referem aos seguintes genes*: vitellogenin, sodium channel protein Nach, leucine-rich repeat-containing protein 70, serine-rich adhesin for platelets-like, major royal jelly protein 3 (mrjp3) gene* e *cuticular protein 5* (*CPR5)*, respectivamente Fonte: Da autora.

4. CONCLUSÕES

O alto grau de conservação da estrutura dos genes e da sequência das proteínas dos genes da via de insulina e *egfr* sugerem que estas vias participem dos mesmos processos biológicos nas três espécies de abelhas estudadas. A análise do transcriptoma confirmou o gene *vitellogenin* como um bom marcador de rainhas e revelou outros marcadores desta casta em tecidos da cabeça.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrews S. (2010). **FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data**. Acessado em 13 de jun. 2020. Disponível em: http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.

ANDERS, S.; PYL, P. T.; HUBER, W. HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. **Bioinformatics**, v. 31, n. 2, p. 166–169, 2015.

BARCHUK, A. R. et al. Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee Apis mellifera. **BMC Developmental Biology**, v. 7, p. 1–19, 2007.

BERRIMAN, M.; RUTHERFORD, K. Viewing and annotating sequence data with Artemis. **Briefings in bioinformatics**, v. 4, n. 2, p. 124–132, 2003.

FAUSTINO, C. D. et al. First record of emergency queen rearing in stingless bees (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). **Insectes Sociaux**, v. 49, n. 2, p. 111–113, 2002.

FORMESYN, E. M. et al. Reproduction of honeybee workers is regulated by epidermal growth factor receptor signaling. **General and Comparative Endocrinology**, v. 197, p. 1–4, fev. 2014.

KAMAKURA, M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. **Nature**, v. 473, n. 7348, p. 478–483, 2011.

KIM, D.; SALZBERG, S. L. TopHat-Fusion: An algorithm for discovery of novel fusion transcripts. **Genome Biology**, v. 12, n. 8, 2011.

MADEIRA, F. et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, p. W636–W641, 2019.

MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD/SPARCLE: Functional classification of proteins via subfamily domain architectures. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D200–D203, 2017.

MICHENER, C. D. **The Bees Of The Word**. [s.l: s.n.]. v. 134

PRIYAM, A. et al. Sequenceserver: A Modern Graphical User Interface for Custom BLAST Databases. **Molecular Biology and Evolution**, v. 36, n. 12, p. 2922–2924, 2019.

RUTHERFORD, K. et al. Artemis: sequence visualization and annotation. **BIOINFORMATICS**, v. 16, n. 10, p. 944–945, 2000.

TEIXEIRA, L. V. PRODUÇÃO DE RAINHAS EM COLÔNIAS DE Plebeia lucii. 2007.

TRAPNELL, C. et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 511–515, 2010.

TRAPNELL, C. et al. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 46–53, 2013.

WINSTON, M. L. (2003). **A biologia da abelha**. Traducao de Carlos A. Osowski - Porto Alegre: Magister. 276p. ; il.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

ANÁLISE DE GENES CANDIDATOS A REGULADORES DA DETERMINAÇÃO DE CASTAS EM ABELHAS

IZABELLA CRISTINA SILVA[1]; MÁRCIO JOSÉ DOS SANTOS FILHO[1]; FLÁVIA CRISTINA DE PAULA FREITAS[1]

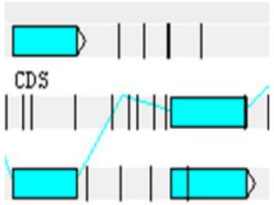
Análise de conservação



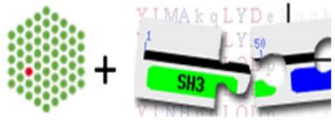
Genes conhecidos de *A. mellifera*



Identificação dos ortólogos



Anotação dos genes



Análise de domínios

SIAS

Análise de similaridade

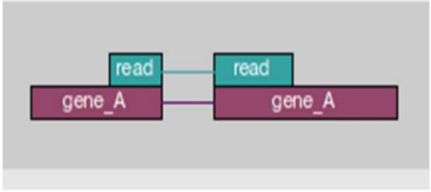
Análise molecular

Dados públicos *Sequence Read Archive*

Análise de qualidade

TopHat

Alinhamento de *reads* no genoma



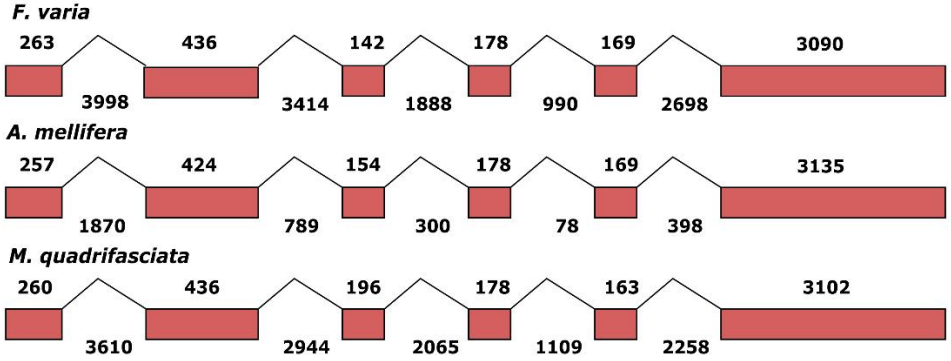
Contagem de leituras

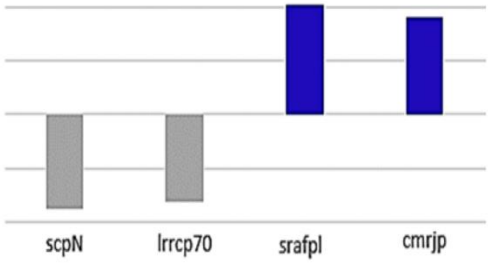
Cufflinks

Normalização de dados

Resultados

PTkc InRs like			
Amel	100%		
Fvar	97.08%	100%	
Mqua	97.44%	100%	100%
	Amel	Fvar	Mqua





COMPARAÇÃO POR DOCKING MOLECULAR DA ATIVIDADE DE CURCUMINA E SEUS ANÁLOGOS EM RECEPTORES ENVOLVIDOS NO CÂNCER DE BEXIGA

JOÃO CARLOS RODRIGUES JUNIOR[1]; FERNANDA SEVERO SABEDRA SOUSA[2], BRUNA SILVEIRA PACHECO[3], TIAGO COLLARES[4]; CLAUDIO M. P. PEREIRA[5]; FABIANA K. SEIXAS[6]

[1]UFPel – Universidade Federal de Pelotas – jcrodriguesjr@hotmail.com
[2]UFPel – Universidade Federal de Pelotas- nandinha_sousa4@hotmail.com
[3]UFPel – Universidade Federal de Pelotas - pacheco.sbruna@gmail.com
[4]UFPel – Universidade Federal de Pelotas- collares.t@gmail.com
[5]UFPel – Universidade Federal de Pelotas - claudiochemistry@gmail.com
[6]UFPel – Universidade Federal de Pelotas – seixas.fk@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um dos mais graves problemas de saúde pública no Brasil e no mundo, sendo também a segunda maior causa de morte, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares. A estimativa mais recente dos casos de câncer no mundo foi em 2018, a qual apontou que 18 milhões de pessoas foram acometidas com essa doença sendo dessas 9,6 milhões vítimas fatais, neste mesmo ano foi diagnosticado mais de 500 mil novos casos de câncer de bexiga assim caracterizando-o como a nono tipo de neoplasia maligna mais incidente no mundo (INCA,2020).

Neste sentido, tendo em vista que a mortalidade por câncer tem aumentando muito nos últimos anos, far-se-á necessária a descoberta de novos fármacos, os quais tenham menos efeitos adversos e uma melhor tolerabilidade pelo paciente. Tendo isso em mente a curcumina é uma alternativa que vem ganhando destaque, pois vem demonstrando benefícios terapêuticos para doenças crônicas como artrite, inflamação, síndrome metabólica, obesidade, doenças neurodegenerativas e vários tipos de canceres (GIORDANO; TOMMONARO, 2019).

A curcumina é uma molécula que pertence à classe dos polifenóis que pode ser isolada naturalmente ou obtida por síntese química. A curcumina tem algumas limitações no seu uso que pode causar a atenuação de sua eficácia e uma diminuição dos seus efeitos terapêuticos tais como rápida metabolização, baixa absorção oral (MIRZAEI *et al.*, 2016). A fim de suprir estas limitações, os derivados sintéticos de curcumina são alvos de estudos para se obter novos agentes farmacoterapêuticos, assim como sua combinação com outras estratégias com objetivo de se obter maior solubilidade e biodisponibilidade, efeitos terapêuticos melhorados e baixos efeitos adversos.

Com isso o objetivo deste trabalho foi comparar por docking molecular a eficácia de moléculas análogas da curcumina em receptores no qual já é conhecido a atuação da curcumina e que são relevantes para o descobrimento de novos fármacos para o tratamento do câncer de bexiga.

2. METODOLOGIA

Para a escolha dos receptores foi levado em consideração dois aspectos, o primeiro seria a certeza de que a curcumina se ligue no mesmo baseado no que já se tem descrito na literatura, e o segundo seria sua importância no

tratamento oncológico. Com isso chegamos em três receptores para este trabalho.

ALK5 receptor de TGFβ (fator de crescimento transformador beta) no qual é um importante marcador de câncer maligno pois sua função é o controle da proliferação e diferenciação celular (KANDAGALLA *et al.*, 2017). COX-2 (Ciclo-oxigenase-2) induz a atividade células tronco cancerígenas, promove a resistência a apoptose, proliferação, angiogênese, inflamação, metástase e promove a resistência das células cancerosas à quimio e radioterapia (SOHILAIT; PRANOWO; HARYADI, 2017). TOPOI (DNA Topoisomerase-I) esta que é uma enzima essencial que atua no DNA durante os processos celulares como replicação, transcrição, recombinação e remodelação da cromatina, por possuir papel crítico durante esses processos são alvos interessantes na busca de drogas para o câncer (KUMAR; BORA, 2014).

As moléculas A ((1E,6E)-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)hepta-1,6-dieno-3,5-diona, B ((2E,6E)-2,6-bis(4-fluorobenzilideno)ciclohexanona) e C ((2E,6E)-2,6-bis(4-clorobenzilideno)ciclohexanona) foram sintetizadas e caracterizadas pelo Laboratório de Lipidômica e Bio-orgânica (UFPel).

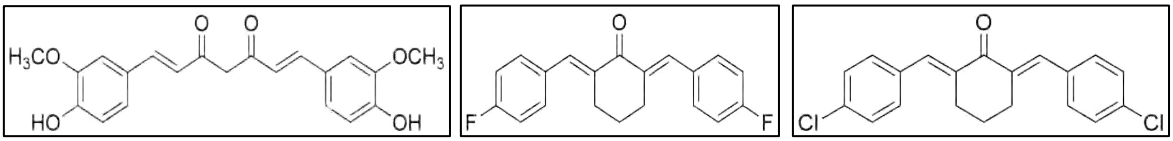


Figura 1. Estruturas das moléculas A, B e C respectivamente

Os compostos foram desenhados em 2D pelo programa Chemdraw 2018, e transformadas em ligantes 3D pelo programa Molecular Operating Environment 2015 (MOE) onde foi utilizada a ferramenta QuickPrep para adicionar hidrogênios polares e analisar e corrigir as ligações dos átomos das moléculas. Todos os átomos tiveram suas cargas assimiladas na estrutura e posteriormente foram minimizadas em campo de força MMFF94x com gradiente de 0.01 (TOSCO; STIEFL; LANDRUM, 2014). A molécula foi salva na extensão mol2 e foi feita sua preparação com o programa Auto Dock Tools (ADT ver.1.5.6) onde as cargas parciais foram calculadas e os ligantes foram convertidos em pdbqt.

Os receptores cristalizados foram obtidos do Protein Data Bank (ALK5 = 1RW8, COX-2 = 5GMN e TOPO-I = 1K4T) onde foram preparadas pelo ADT, no qual foram removidos todas moléculas de água, os ligantes encontrados na estrutura foram removidos e sua localização foi utilizada como sítio ativo pelo gridbox. Após foi adicionado hidrogênios polares na estrutura e foi computado as cargas gasteiger para todos os átomos dos receptores, assim salvando no formato de arquivo pdbqt.

O docking molecular foi realizado pelo Autodock Vina 1.1.2 (O. TROTT, A. J. OLSON, 2010) onde foi escrito no seu arquivo de configuração a posição do sítio ativo nos eixos X, Y e Z e o tamanho da gridbox onde foi escolhido o padrão de 40x40x40 para todos os testes. Foi obtido o melhor resultado com base na menor energia livre de ligação e a visualização 3D da posição da molécula, por fim as interações dos ligantes com os receptores e suas imagens foram geradas pelo software Discovery Studio Visualizer 2019 e Schröndinger Maestro.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após realizarmos os testes observamos que os análogos da curcumina tem menor energia de ligação que a curcumina na forma clássica, a tabela abaixo mostra todos os resultados das simulações realizadas. Podemos ver que no receptor ALK5 e TOPO-I a molécula B teve menor energia de ligação, fazendo com que ela tenha maior força de ligação e uma maior estabilidade do que a curcumina. Já na COX-2 a molécula com menor energia de ligação foi a C. Ao comparar os aminoácidos que tiveram interação com as moléculas podemos ver que na maior parte dos casos houve ligações do tipo ponte de hidrogênio mostrando uma interação estável, também se obteve aminoácidos iguais interagindo com as três moléculas, assim reforçando que os análogos da curcumina podem ter a funcionalidade semelhante da curcumina.

É interessante ressaltar que no caso da TOPO-I todas as moléculas tiveram uma pequena interação com a molécula de DNA cristalizada, assim podendo causar algum tipo de dano na sua estrutura o que seria interessante a sua utilização para tratamento oncológico. Também a o analisar as figuras 1 e 2 podemos perceber que todas as moléculas se encaixam nos sítios dos receptores, os análogos se ligam de forma integral ou seja sem ser necessário uma mudança de ângulo da molécula já a curcumina parece menos instável devido ao seu tamanho e sua pequena dobra no qual é necessária para encaixar dentro do sitio.

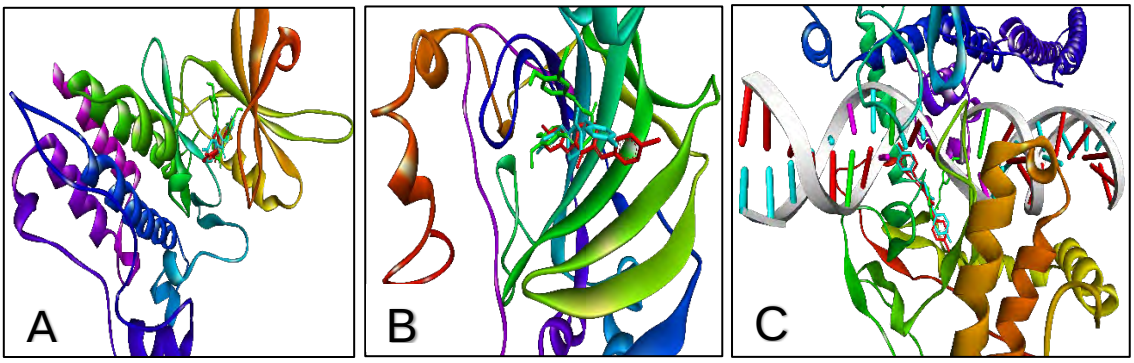


Figura 1. Representação 3D dos ligantes com menor energia livre de ligação em receptores com perspectiva 3D em cartoon ALK5 (A), COX-2 (B) e TOPO-I (C). Ligantes A (verde), B (ciano) e C (vermelho).

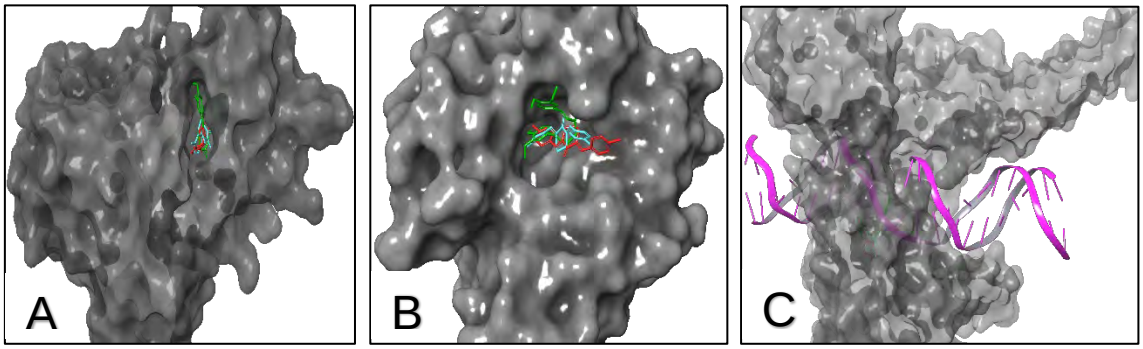


Figura 2. Representação 3D dos ligantes com menor energia livre de ligação em receptores com perspectiva de superfície proteica ALK5 (A), COX-2 (B) e TOPO-I (C). Ligantes A (verde), B (ciano) e C (vermelho).

Tabela. Resultados do docking molecular, apresentando a energia livre de ligação e a interação dos aminoácidos dos receptores com as moléculas.

Receptor	Molécula Alvo	Energia Livre de Ligação ΔG (kcal/mol)	Interações
ALK5	A	-9,8	ILE211, LYS213, VAL119, ALA230, LYS232, LEU278, SER280, HIS283, GLY286, LEU340,
ALK5	B	-10,5	LYS213, VAL119, LYS232, LEU260, LEU278, VAL279, SER280, ASP290, LEU340, ALA350,
ALK5	C	-10,2	LYS213, VAL119, LYS232, LEU260, LEU278, SER280, LYS337, LEU340, ALA350,
COX-2	A	-7,6	GLN92, HIS94, VAL121, VAL134, VAL142, LEU197, THR198, THR199,
COX-2	B	-8,3	HIS94, VAL121, PHE130, VAL142, LEU197, THR198,
COX-2	C	-8,8	GLU69, ILE91, GLN92, VAL121, PHE130, VAL142, LEU197, VAL206,
TOPO I	A	-8,9	GLU356, ARG364, LYS425, DNA-DC112, DNA-D113
TOPO I	B	-10,3	PRO357, PHE361, LYS374, ILE420, GLN421, DNA-DA113, DNA-DA114
TOPO I	C	-10,1	PRO357, PHE361, LYS374, ILE420, GLN421, DNA-DA113, DNA-DA114

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados encontrados concluímos que nossos análogos de curcumina são promissoras moléculas para com o tratamento do câncer de bexiga pois sabe-se que na maioria dos casos esses receptores influenciam diretamente no tratamento (CZACHOROWSKI *et al.*, 2012; HEVENER *et al.*, 2018; PICKUP; NOVITSKIY; MOSES, 2013), assim com as nossas moléculas pode-se obter resultados melhores do que a própria curcumina. Entretanto só foram realizados testes *in silico,* sendo assim mais ensaios deverão ser feitos para demonstrar sua atividade biológica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CZACHOROWSKI,M.J.*et al.*Cyclooxygenase-2 Expression in Bladder Cancer and Patient Prognosis:Results from a Large Clinical Cohort and Meta-Analysis.**PLoS ONE**,*[S. l.]*,v.7,n.9, 2012.

GIORDANO,A.;TOMMONARO,G.Curcumin and cancer.**Nutrients**,*[S.l.]*,v.11,n.10,p.1–19, 2019.

HEVENER, K. E. *et al.* Recent developments in topoisomerase-targeted cancer chemotherapy. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, *[S. l.]*, v. 8, n. 6, p. 844–861, 2018.

KANDAGALLA, S. *et al.* Molecular docking analysis of curcumin analogues against kinase domain of ALK5. **In Silico Pharmacology**, *[S. l.]*, v. 5, n. 1, p. 1–9, 2017.

KUMAR, A.; BORA, U. Molecular docking studies of curcumin natural derivatives with DNA topoisomerase I and II-DNA complexes. **Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences**, *[S. l.]*, v. 6, n. 4, p. 285–291, 2014.

MIRZAEI, H. *et al.* Curcumin: A new candidate for melanoma therapy? **International Journal of Cancer**, *[S. l.]*, v. 139, n. 8, p. 1683–1695, 2016.

O. TROTT, A. J. OLSON. Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. **Journal of computational chemistry**, *[S. l.]*, v. 31, p. 455–461, 2010.

PICKUP, M.; NOVITSKIY, S.; MOSES, H. L. The roles of TGFβ in the tumour microenvironment. **Nature Reviews Cancer**, *[S. l.]*, v. 13, n. 11, p. 788–799, 2013.

SOHILAIT, M. R.; PRANOWO, H. D.; HARYADI, W. Molecular docking analysis of curcumin analogues with COX-2. **Bioinformation**, *[S. l.]*, v. 13, n. 11, p. 356–359, 2017.

TOSCO,P.;STIEFL,N.;LANDRUM,G.Bringing the MMFF force field to the RDKit: Implementation and validation.**Journal of Cheminformatics**,*[S. l.]*, v. 6, n. 1, p. 1–4, 2014.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

COMPARAÇÃO POR DOCKING MOLECULAR DA ATIVIDADE DE CURCUMINA E SEUS ANÁLOGOS EM RECEPTORES ENVOLVIDOS NO CÂNCER DE BEXIGA

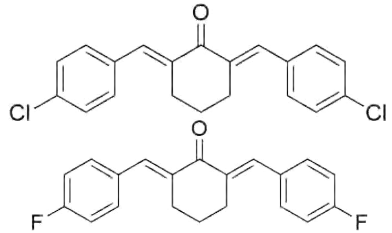
JOÃO CARLOS RODRIGUES JUNIOR[1]; FERNANDA SEVERO SABEDRA SOUSA[2], BRUNA SILVEIRA PACHECO[3], TIAGO COLLARES[4]; CLAUDIO M. P. PEREIRA[5]; FABIANA K. SEIXAS[6]

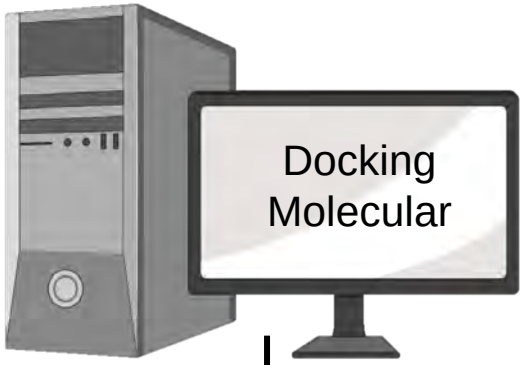


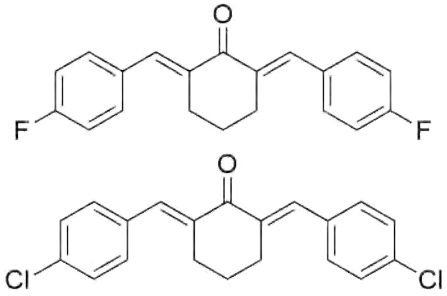
Curcumina extraída do açafrão-da-Índia



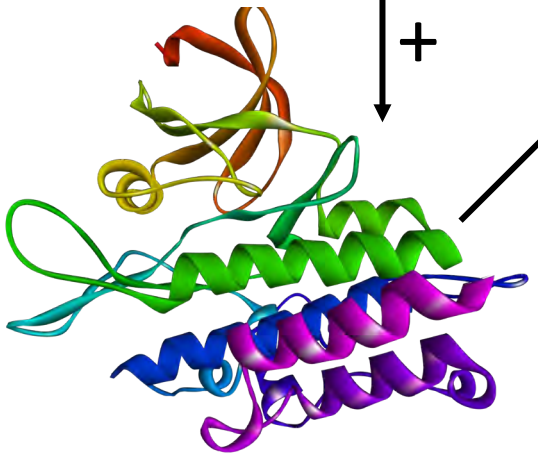
Síntese Química



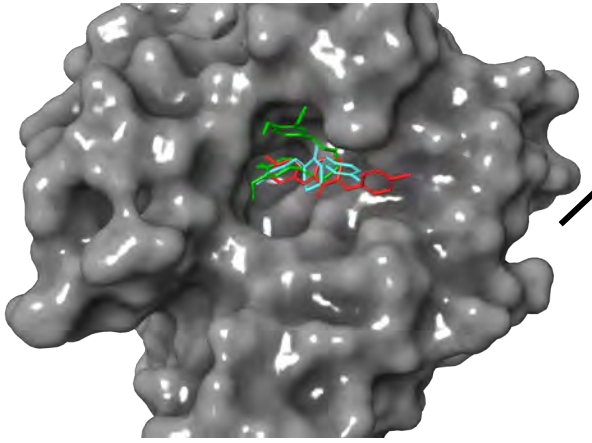


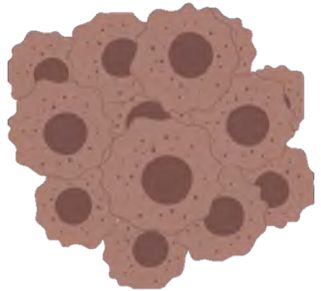


Moléculas com maior potencial



Receptores de interesse
ALK5, COX-2 e TOPO-I





Células Tumorais

DESENHO DE *PRIMERS IN SILICO* COMO POTENCIAL MARCADOR MOLECULAR PARA *PLASMODIUM FALCIPARUM* UTILIZANDO BIOINFORMÁTICA

Julia Weber Ferraboli[1]; Brendon Egon Kormann Staloch[2]; Michelle Giovana Schaldach Morgado[3]; André Oliveira de Souza Lima[4]

[1]Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI – juliawf@edu.univali.br
[2] Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI – brendon.egon@edu.univali.br
[3] Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI – michellemorgado@edu.uinivali.br
[4] Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI – lima@univali.br

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a bioinformática tem sido utilizada para responder complexas questões biológicas, tornando-se uma área de pesquisa interdisciplinar. Esta tecnologia de informação envolve o desenvolvimento de ferramentas computacionais que organizam, armazenam e recuperam informações de banco de dados (FULLER *et al*., 2013). A bioinformática é apontada como uma tecnologia capaz de contribuir significativamente na exploração de dados biológicos, viabilizando a execução, visualização e gestão dos dados através da internet (CAVALCANTI *et al*., 2005). Desta forma, verifica-se um crescimento exponencial da quantidade de dados genômicos disponíveis em banco de dados públicos, resultante dos crescentes avanços na tecnologia de sequenciamento (PAGANI *et al*., 2012).

Assim, os dados genômicos disponíveis combinados com ferramentas de bioinformática permitem o rastreamento de marcadores altamente informativos (LI *et al*., 2009). Estudos realizados por Pagani e colaboradores (2012) apontam que marcadores moleculares auxiliam no tratamento de questões biológicas, no mapeamento genético, no diagnóstico de doenças, na investigação forense, na análise populacional e em estudos ecológicos. Os marcadores moleculares baseados em PCR correspondem a uma das técnicas de diagnóstico molecular amplamente utilizados nos estudos biológicos; sendo passíveis de automação e, se bem desenhados, altamente específicos (FREDSLUND *et al*., 2006). Recentemente a técnica vem sendo empregada como uma estratégia alternativa e complementar aos testes parasitológicos clássicos (WONG *et al.*, 2014).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) 228 milhões de pessoas contraíram malária em 2018, sendo que 405.000 casos evoluíram a óbito. A transmissão ocorre através da picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*, que transmite o parasita *Plasmodium* pela saliva (WHO, 2019). Dentre as várias espécies, *Plasmodium falciparum (P. falciparum)* causa os quadros mais graves da doença e é responsável pela maior parte dos óbitos (WEISS *et al*., 2019). O diagnóstico da malária normalmente ocorre através de achados microscópicos, porém relata-se comprovada diminuição da sensibilidade e especificidade em baixa densidade parasitária e infecções mistas (BERZOSA *et al.,* 2018). Assim, o presente estudo objetivou desenvolver um novo método de diagnóstico molecular para detecção de *P. falciparum*, através da prospecção de potenciais *primers in sílico*.

2. METODOLOGIA

Utilizando a base de dados de sequência genômica disponível no *GenBank* do *National Center For Biotechnology Information* (NCBI) averiguou-se um gene *housekeeping* específico e essencial para sobrevivência de *P. falciparum*, associado ao transporte de hexose do protozoário (JOËT; KRISHNA, 2004). A recuperação de sequências de DNA para comparação foi realizada pelo algoritmo *Nucleotide BLAST* da base de dados NCBI. Limitou-se a busca ao gênero *Plasmodium*, excluindo *P. falciparum*, com o intuito de determinar oligonucletídeos iniciadores específicos para o agente etiológico. O arquivo FASTA contendo 50 sequências alinhadas foi arquivado, priorizando aquelas com maior porcentagem de similaridade em nucleotídeos (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

O alinhamento múltiplo de sequências ocorreu pelo uso da ferramenta *Clustal Omega* da plataforma *European Bioinformatics Institute* (EBI) (MADEIRA *et al.*, 2019). Locais de consenso ruins com regiões variáveis e exclusivas para *P. falciparum* foram escolhidas para prospecção do *primer*, permitindo diferenciar a espécie das demais (QIMING, 2015). Identificou-se as regiões ideais do gene para o desenho dos *primers forward* e *reverse* contendo em torno de 30 pares de bases, determinando igualmente a região correspondente ao início (*from*) e fim (*to*) dos mesmos; com o produto de amplificação entre eles – cerca de 200 pares de bases (OLIVEIRA *et al.*, 2011). O programa Primer-BLAST do NCBI permitiu a obtenção das sequências do *primer*. Através do complemento reverso, foi possível conferir se a região variável continuou inserida no fragmento de DNA prospectado (YE *et al.*, 2012).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenho do *primer* em questão foi obtido sem alterar nenhum parâmetro padrão do programa Primer-BLAST. A região escolhida levou em consideração à baixa quantidade de bases nitrogenadas Guanina e Citocina (GC) presente no gene alvo, bem como a presença de várias regiões de baixa complexidade, dificultando o processo de seleção. A sequência do par de oligonucleotídeos iniciadores gerado possui tamanho de aproximadamente 23 pares de bases, temperatura de *melting* (*Tmelting*) de 56.72 °C e 54.1°C e concentração GC de 33.33% e 36.37% (Tab. 1). Ainda, obteve-se uma variação inferior à 5°C no T*melting* do par de *primers*, facilitando a escolha da temperatura para o anelamento no PCR. Os resultados obtidos corroboram com estudos realizados por Queiroz e colaboradores (2017). Foi possível identificar igualmente que a região variável continuou inserida na sequência de iniciadores escolhidos para o diagnóstico de *P. falciparum* (YE *et al.*, 2012).

Visando alcançar bons resultados na PCR se faz necessário que os *primers* sejam específicos, anelando-se apenas ao DNA alvo. Portanto, é necessário atentar para que a composição dos mesmos não propicie a formação de estruturas indesejadas. Algumas características influenciam diretamente no bom desempenho do iniciador como o tamanho – elevados comprimentos favorecem a presença de bases complementares; a T*melting* – deve ser similar entre os pares de *primers;* e ainda a concentração GC – influencia diretamente na temperatura da etapa de desnaturação devido à sua

alta estabilidade (QUEIROZ, 2017). Há protocolos que indicam parâmetros para desenho de *primeres* com tamanho entre 15 e 35 pares de bases, *Tmelting* superior a 50°C e conteúdo GC entre, no máximo 25 – 75% (New England BioLabs, 2020)

Tabela 1. Desenho do *primer* obtido através programa PRIMER-BLAST. Destaca-se a sequência de bases *dos primers Forward* e *Reverse*, tamanho de pares de bases, *Tmelting* (Tm) e porcentagem de Guanina e Citocinas (GC%).

Sequência	Tamanho	Tm	GC%
Forward TCTGGTTTACAACAATTTACAGGT	24	56.72	33.33
Reverse AACTATGAAAAGAATCGAAGGG	22	54.19	36.37

O protozoário *P. falciparum* é uma preocupação constante em países com altas taxas de infectados, justamente devido à sua alta letalidade. Evidencia-se que a melhor estratégia para o controle da malária é o diagnóstico rápido e preciso do parasita, seguido do tratamento específico (GERSTL *et al.*, 2010). Diagnósticos de qualidade podem evitar erros que acarretariam um maior número de morbidade e de mortalidade. Berzosa e colaboradores (2018) compararam a eficiência entre os principais métodos de diagnóstico para a malária − a microscopia, o teste de diagnóstico rápido e o PCR. Os autores concluíram que o método de PCR é o “padrão ouro” para a doença e que os outros métodos resultaram em muitos falsos negativos; entretanto, o custo ainda acaba sendo elevado para alguns locais devido à necessidade de laboratórios com infraestrutura adequada (BERZOSA *et al.,* 2018). Todavia, a letalidade associada à *P. falciparum* demanda um diagnóstico preciso para a espécie em questão, no qual a criação de um método específico de identificação pode reduzir o tempo para o início do tratamento adequado (JOHNSTON *et al.*, 2006).

4. CONCLUSÕES

Evidencia-se que as ferramentas de bioinformática são valiosas para a prospecção e desenho de *primers in* silico voltados para diagnóstico de doenças. Devido a utilização destas, foi possivel desenvolver um potencial teste de diagnóstico molecular específico para *P. falciparum* − agente etiológico responsável pelos quadros mais graves de malária e pela maior parte dos óbitos − a partir de um gene essencial existente no parasita. Como próximos passos espera-se verificar laboratorialmente sua eficácia, através da síntese dos *primers* e validação em PCR.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERZOSA, P. *et al*. Comparison of three diagnostic methods (microscopy, RDT, and PCR) for the detection of malaria parasites in representative samples from Equatorial Guinea. **Malaria Journal**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 333-345, 2018.

CAVALCANTI, M. C. *et al*. Managing structural genomic workflows using Web services. **Data & Knowledge Engineering**, [S.L.] v. 53, n. 1, p. 45–74, 2005.

FULLER, J. C. *et al*. Biggest challenges in bioinformatics. **EMBO reports**, [S.L.], v. 14, n. 4, p. 302–304, 2013.

FREDSLUND, J. *et al*. A general pipeline for the development of anchor markers for comparative genomics in plants. **BMC genomics**, [S.L], v. 7, n. 1, p. 207-217, 2006.

GERSTL, S. *et al*. Assessment of two malaria rapid diagnostic tests in children under five years of age, with follow-up of false-positive pLDH test results, in a hyperendemic falciparum malaria area, Sierra Leone. **Malaria Journal**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 28-38, 2010.

JOËT, T; KRISHNA, S. The hexose transporter of Plasmodium falciparum is a worthy drug target. **Acta Tropica**, [S.L.], v. 89, n. 3, p. 371-374, 2004.

JOHNSTON, S. P. *et al*. PCR as a Confirmatory Technique for Laboratory Diagnosis of Malaria. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 44, n. 3, p. 1087-1089, 2006.

LI, J. *et al.* Hundreds of microsatellites for genotyping Plasmodium yoelii parasites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [S.L.], v. 166, n. 2, p. 153–158, 2009.

MADEIRA, F. *et al*. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 47, n. 1, p. 636-641, 2019.

NEW ENGLAND BIOLABS. **Guidelines for PCR Optimization with Taq DNA Polymerase**. 2020. Acesso em: 16 ago. 2020. Online. Disponível em: https://www.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/guidelines-for-pcr-optimization-with-taq-dna-polymerase.

PAGANI, I. *et al.* The Genomes OnLine Database (GOLD) v.4: status of genomic and metagenomic projects and their associated metadata. **Nucleic Acids Research,** [S.L.], v. 40, n. 1, p. 571–579, 2011.

QIMING, C. *et al*. Mining for sensitive and reliable species-specific primers for PCR for detection of Cronobacter sakazakii by a bioinformatics approach. **Journal Of Dairy Science**, [S.L.], v. 98, n. 8, p. 5091-5101, 2015.

OLIVEIRA, E. M. *et al*. Utilização de ferramentas de bioinformática na construção de primers para detecção de sequências específicas de DNA. Rio de Janeiro: **Embrapa Agroindústria de Alimentos**, 2011.

QUEIROZ, J. *et al*. Desenho e Validação de Primers In Sílico para Detecção do Vírus Sincicial Respiratório Humano. **Revista Fimca**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 17-30, 2017.

WEISS, D. *et al*. Mapping the global prevalence, incidence, and mortality of Plasmodium falciparum, 2000–17: a spatial and temporal modelling study. **The Lancet**, [S.L.], v. 394, n. 10195, p. 322-331, 2019.

WONG, S. S. *et al.* Molecular diagnosis in clinical parasitology: when and why? **Experimental Biology And Medicine**, [S.L.], v. 239, n. 11, p. 1443-1460, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Word Malaria Report 2019**. Global Malaria Programme, 4 dez. 2019. Acessado em: 15 ago. 2020. Online. Disponível em: https://www.who.int/publications/i/item/9789241565721.

YE, J. *et al*. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **Bmc Bioinformatics**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 134-145, 2012.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

DESENHO DE PRIMERS *IN SILICO* COMO PONTENCIAL MARCADOR MOLECULAR PARA *PLASMODIUM FALCIPARUM* UTILIZANDO BIOINFORMÁTICA

JULIA WEBER FERRABOLI[1]; BRENDON EGON KORMANN STALOCH[2];
MICHELLE GIOVANA SCHALDACH MORGADO[4]; ANDRE OLIVEIRA DE SOUZA LIMA[4]



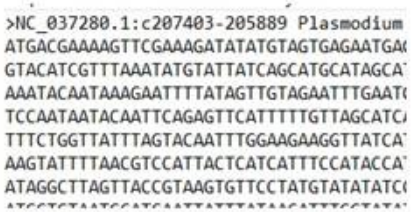
Base de dados *GenBank* - NCBI



Gene *housekeeping* de *P. falciparum*



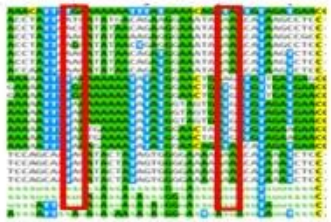
Comparação das sequências de DNA



Geração do arquivo FASTA

Clustal Omega

Alinhamento múltiplo das sequências



Identificação das regiões variáveis



Demarcação dos *primers*

Primer-BLAST

Desenho do *primer*

Análises *in silico* de lectinas de *Musa acuminata ssp. Malaccensis*: uma abordagem estrutural

MABELLE CARDIA NUNES DOS SANTOS[1]; ALESSANDRA NEIS[2]; ANA CLAUDIA OLIVEIRA DE FREITAS[3]; RAFAEL WOLOSKI DOS SANTOS[4]; LUCIANO DA SILVA PINTO[5]

[1]*Universidade Federal de Pelotas – mabellecardia@hotmail.com*
[2]*Universidade Federal de Pelotas – alessandraneisbiotec@gmail.com*
[3]*Universidade Federal de Pelotas – anaclaudia.olvf@outlook.com*
[4]*Universidade Federal de Pelotas – rafaelwoloski@gmail.com*
[5]*Universidade Federal de Pelotas – ls_pinto@hotmail.com*

1. INTRODUÇÃO

Lectinas são um grupo de proteínas que possuem a capacidade de se ligar a carboidratos/glicoproteínas de forma reversível e seletiva, se encontram amplamente distribuídas na natureza e participam de diversos processos biológicos. Podem ser divididas em famílias de acordo com suas características estruturais específicas (SINGH *et al.*, 2004), como por exemplo, a estrutura tridimensional dos sítios de ligação, que se apresentam conservados a nível dos aminoácidos. A família das lectinas relacionadas a Jacalina engloba lectinas como a isolada do fruto de *Musa Acuminata*, popularmente conhecida como banana. As lectinas do gênero *Musa* já demonstraram capacidade imunomoduladora, antiproliferativa, cicatrizante e antiviral (HOPPER et al., 2017; SWANSON et al., 2010). Dentro do gênero *Musa* spp., seção eumusa, estão presentes três diferentes espécies determinadas de acordo com seus antecedentes genéticos, *Musa acuminata*, *Musa Balbisiana*, *Musa schizocarpa* e algumas espécies de *Musa australiana*. (JANSSENS et al., 2016).

Ainda que a maioria dos estudos se concentre nas diferentes atividades biológicas da lectina de *Musa acuminata*, a Banlec, pouco se sabe sobre suas variantes estruturais (KENNEDY et al., 1995). A vasta diversidade estrutural e de especificidade está intimamente ligada as diferentes atividades biológicas das lectinas (DAMME et al., 1998). Ou seja, existem domínios de reconhecimento a carboidratos altamente conservados, que apresentam informações a respeito da funcionalidade dessas proteínas.

A partir do surgimento de ferramentas de bioinformática cada vez mais precisas, houve um grande crescimento na quantidade de sequências disponíveis em bancos de dados. Isto possibilitou a elucidação de estruturas proteicas tridimensionais para análises estruturais e conformacionais, o que permite averiguar as diferentes configurações que modificam sua atividade (CHEN, 2015). Levando em consideração a falta de informações quanto as variantes estruturais das lectinas presentes na subespécie *Malaccensis* de *Musa acuminata*, o objetivo deste trabalho foi modelar e analisar as diferenças nos

sítios de ligações a carboidratos destas proteínas, tendo em vista que mudanças pontuais nestes locais podem levar a alteração das atividades biológicas.

2. METODOLOGIA

Com o objetivo de encontrar lectinas do gênero *Musa*, foi utilizado a ferramenta de BLAST para realizar o alinhamento local (BLASTp) das sequências de lectina de *M. acuminata* (AAM48480.1), obtidas no banco de dados do NCBI, levando em consideração os seguintes paramêtros: *database* de proteínas não redundantes (nr) e restringindo a organismos pertencentes a família *Musaceae* (ALTSCHUL et al., 1990). Foi utilizada a ferramenta CLUSTAL (BROWN et al., 2007) para fazer o alinhamento global das sequências que tiveram as maiores identidades na etapa anterior a fim de identificar diferenças e semelhanças globais entre elas.

Para obter a posição dos sítios de ligação a carboidratos para análise de modificações, foi utilizado o UNIPROT (PUNDIR, 2016). Três lectinas que apresentaram diferenças nestes domínios foram escolhidas e suas modelagens foram feitas por homologia através do *software* SWISS-MODEL (PEITSCH, 1997). Estas estruturas foram visualizadas no programa Pymol Molecular Graphics (versão 2.0, Schrodinger) e alinhadas às estruturas de referência, já identificadas experimentalmente, presentes no banco de dados RCSB PDB (BERMAN et al., 2000). Como base para verificar os sítios de ligação a manose no alinhamento, foi utilizada a sequência de *M. acuminata* (PDB ID: 1X1V) (HIGGINS, 1994).

Posteriormente se realizou o *docking* molecular com moléculas de manose nos sítios de ligação a carboidratos (33-38, 60-63, 105-106, 130-133) através do *software* AutoDock Vina (TANCHUK, 2015), que permite calcular a energia de ligação em kcal/mol entre uma molécula e seu respectivo ligante, assim como visualizar a interação do sítio com o ligante. No *software* PLIP (SALENTIN, 2015), foi possível inferir se a ligação se deu com os aminoácidos corretos e qual foi a interação química formada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, trouxemos as primeiras estruturas tridimensionais das lectinas XP_018673705.1, XP_018673708.1, XP_009417126.1, todas pertencentes à *M. acuminata ssp.* Malaccensis. Na ferramenta BLASTp após o alinhamento local foram somente selecionadas as proteínas que obtiveram a maior identidade em relação a sequência de *M. acuminata* (PDB ID: 1X1V). As lectinas então selecionadas apresentaram 100% de cobertura com esta sequência, e identidades de XP_018673705.1 (96%), XP_018673708.1 (95%), XP_009417126.1 (91%). Na análise global do software CLUSTAL foi possível

aferir que estas lectinas apresentam uma alta similaridade (aproximadamente 95%) e diferenças pontuais entre os sítios de ligação aos carboidratos.

O software SWISS-MODEL foi usado com o objetivo de visualizar a influência que a troca de aminoácidos gera na estrutura dos sítios ativos. Conforme os valores obtidos do QMEAN (Tabela 1) é possível aferir que a modelagem foi bem sucedida. Ademais, as três utilizaram a molécula 4pif.1.A como *template* e quando alinhadas, apresentaram valor um RMSD próximo de zero, o que indica que possuem poucas diferenças estruturais.

Tabela 1. Valores de parâmetros obtidos após a modelagem no swiss-model.

Sequência	QMEAN	QMGE	Identidade
XP_018673705.1	2,51	0,99	92,20%
XP_018673708.1	2,34	0,99	92,91%
XP_009417126.1	2,18	0,99	97,16%
PDB ID	4pif.1.A	4pif.1.A	4pif.1.A

A partir do *docking* molecular encontramos que, mesmo com uma baixa energia de ligação (tabela 2, figura 1), todas moléculas apresentam potencial de ligação com a manose, ocupando o mesmo sítio dos ligantes da molécula resolvida usada como base (PDB ID: 1X1V). Assim, foi possível inferir que existe a capacidade de se ligar a esse carboidrato, assim como outras lectinas (SINGH *et al.*, 2004) - porém, isso só pode ser comprovado a partir de testes *in vitro*.

Tabela 2. Média dos valores de energia de ligação dos resultados do *docking* molecular.

Molécula	Energia de ligação (média – kcal/mol)
XP_018673705.1	-4.8
XP_018673708.1	-4.2
XP_009417126.1	-4.4

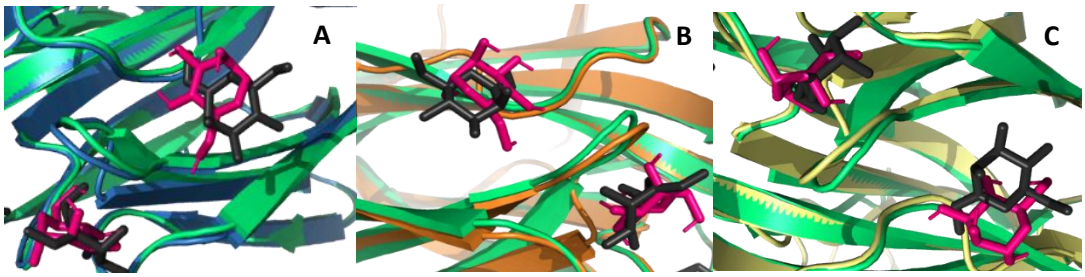


Figura 1. A: Azul XP_009417126.1, B: Laranja XP_018673705.1, C: Amarelo XP_018673708.1 Em preto: manoses de 1X1V (modelo PDB), em rosa pink: manoses do docking, em verde: 1X1V.

4. CONCLUSÕES

Este estudo foi o primeiro a analisar as estruturas de três lectinas de *Musa acuminata ssp.* Malaccensis através de ferramentas bioinformáticas de alinhamento de sequências, modelagem e *docking* molecular. Embora as baixas energias de ligação, os aminoácidos do sítio de ligação a carboidratos estavam interagindo com a manose, demonstrando que essas moléculas têm potencial de ligação a este carboidrato.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, Stephen F. et al. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, [S. l.], v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2. Acesso em: 15 ago. 2020.

CHEN, Runsheng. On bioinformatic resources. Genomics, Proteomics and Bioinformatics, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 1–3, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.02.002. Acesso em: 15 ago. 2020.

GUEX N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*. 1997;18(15):2714-2723. doi:10.1002/elps.1150181505. Acesso em: 16 ago. 2020.

HIGGINS, D. G. CLUSTAL V: multiple alignment of DNA and protein sequences. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), [S. l.], v. 25, p. 307–318, 1994. Disponível em: https://doi.org/10.1385/0-89603-276-0:307. Acesso em: 15 ago. 2020.

LARKIN, MA. Blackshields G, Brown NP, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007;23(21):2947-2948. doi:10.1093/bioinformatics/btm404. Acesso em: 15 ago. 2020.

PEITSCH, M. C. Large scale protein modelling and model repository. Proceedings. International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology, [S. l.], v. 5, p. 234–236, 1997. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9322042. Acesso em: 15 ago. 2020.

PUNDIR S, Martin MJ, O'Donovan C; UniProt Consortium. UniProt Tools. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2016;53:1.29.1-1.29.15. Published 2016 Mar 24. doi:10.1002/0471250953.bi0129s53. Acesso em: 16 ago. 2020.

SALENTIN S, Schreiber S, Haupt VJ, Adasme MF, Schroeder M. PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(W1):W443-W447. doi:10.1093/nar/gkv315. Acesso em: 15 ago. 2020.

TANCHUK VY, Tanin VO, Vovk AI, Poda G. A New Scoring Function for Molecular Docking Based on AutoDock and AutoDock Vina. *Curr Drug Discov Technol*. 2015;12(3):170-178. doi:10.2174/1570163812666150825110208. Acesso em: 15 ago. 2020.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

Análises *in silico* de lectinas de *Musa acuminata ssp. Malaccensis*: uma abordagem estrutural

MABELLE CARDIA NUNES DOS SANTOS[1]; ALESSANDRA NEIS[2]; ANA CLAUDIA OLIVEIRA DE FREITAS[3]; RAFAEL WOLOSKI DOS SANTOS[4]; LUCIANO DA SILVA PINTO[5];

Lectina de *Musa acuminata*

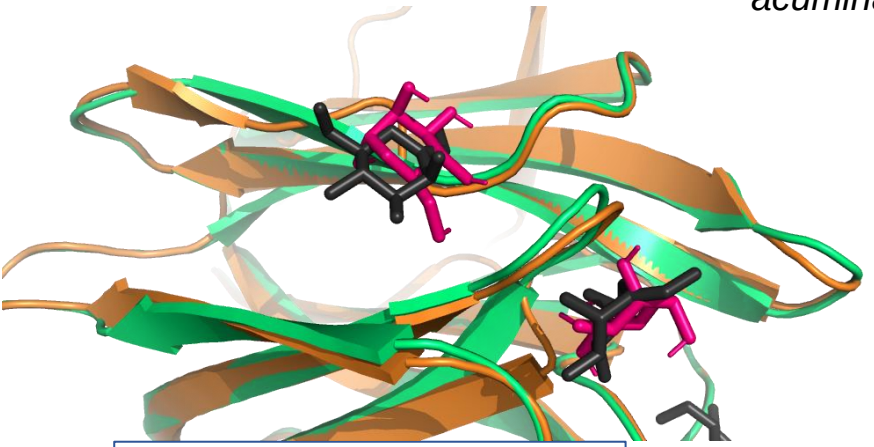
NCBI

Nucleotide BLAST
nucleotide ▶ nucleotide

Seleção de 3 lectinas de *Musa acuminata ssp. Malaccensis*

Clustal Omega

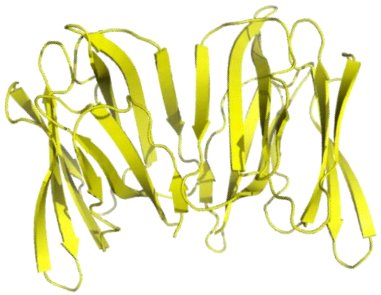
SIB
Swiss-model



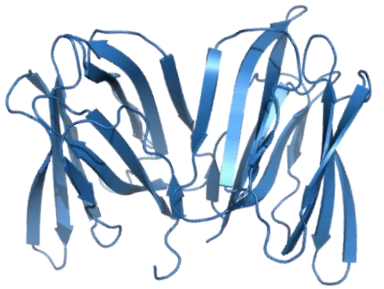
Docking molecular:
Autodock vina



XP_018673705.1



XP_018673708.1



XP_009417126.1

METAGENOMA DE CERVEJAS DE FERMENTAÇÃO MISTA

RENAN EUGÊNIO ARAUJO PIRAINE[1]; DAVID J. SUN[2]; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE[3]; MATTHEW L. BOCHMAN[4]

[1]Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - Universidade Federal de Pelotas - renanbiotec@gmail.com
[2]Department of Molecular and Cellular Biochemistry – Indiana University Bloomington - djsun@iu.edu
[3] Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Universidade Federal de Pelotas – fleivasleite@gmail.com
[4]Department of Molecular and Cellular Biochemistry – Indiana University Bloomington - bochman@indiana.edu

1. INTRODUÇÃO

Tradicionalmente, os métodos de produção de cerveja são divididos em duas categorias: (a) fermentação na parte inferior do fermentador, realizada por *Saccharomyces pastorianus* na produção de cervejas *lagers*; e (b) fermentação na parte superior do fermentador, próximo à superfície do mosto, realizada por *S. cerevisiae* para produção de cervejas *ales*. Ampliando-se o conceito para fermentações mistas, duas novas categorias podem ser incluídas: (c) fermentação não-espontânea, realizada por uma cultura *starter in-house,* que consiste de leveduras e bactérias ácido-láticas (LABs); e (d) fermentação espontânea, realizada por microrganismos inoculados através do ar ambiente em fermentadores abertos (*coolships*), os quais podem ser diferentes microrganismos como enterobacterias, leveduras, LABs, bactérias produtoras de ácido acético (AAB), entre outros (DE ROOS; DE VUYST, 2019; VRIESEKOOP et al., 2012).

Geralmente fermentações mistas são realizadas por leveduras e LABs na criação de cervejas *sours* (também conhecidas como azedas ou ácidas), formando uma microbiota complexa e que age através da sua interação e cooperação (FARIA-OLIVEIRA et al., 2015). Entretanto, grande parte dos cervejeiros não sabe exatamente quais microrganismos estão presentes nem a proporção na suas fermentações. Ainda que leveduras selvagens, LABs e algumas bactérias Gram-positivas sejam consideradas contaminantes em fermentações, esses mesmos gêneros microbianos são altamente desejados para a produção de estilos específicos de cervejas, como as *Lambics* e *American Coolship Ales*, por fornecer *flavors* únicos à essas bebidas (BOKULICH; BAMFORTH; MILLS, 2012). Nesse sentido, os microrganismos e/ou suas enzimas são utilizados através de processos puramente biotecnológicos para realização da acidificação, alcoolização, proteólise, lipólise e na conversão de aminoácidos nos mostos cervejeiros (DE ROOS; DE VUYST, 2019).

O interesse em cervejas de fermentação mista cresce anualmente nos Estados Unidos (SPITAELS et al., 2014), contudo o microbioma presente nessas cervejas e a sua caracterização ainda são pouco explorados, demandando novos estudos confiáveis que permitam aprofundar o conhecimento nesse

método de produção. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi identificar o metagenoma em cervejas de fermentação mista produzidas através dos métodos de fermentação espontânea e não-espontânea.

2. METODOLOGIA

2.1. Amostras

As amostras utilizadas no estudo foram obtidas através do projeto de financiamento coletivo "*Mixed culture metagenomics of the microbes making sour beer*" (DOI 10.18258/13495) hospedado na plataforma *Experiment* (www.experiment.com). 20 amostras, armazenadas a 4 °C, entre lamas e cervejas resultantes de fermentação espontânea e não-espontânea, produzidas por cervejeiros artesanais de diversos estados dos Estados Unidos foram utilizadas.

As amostra de cerveja (50 mL) foram processadas por centrifugação a 1.500 *x g* por 10 min a 4 °C. As amostras de lama ou culturas *starter*, um volume de 1- 5 mL foi suspendido em 50 mL de água ultrapura estéril e tratado como as de cerveja. O *pellet* de células e restos celulares foram suspendidos em 500 uL de 2x DNA/RNA Shield (Zymo Research (Irvine, CA) e armazenados a – 20 °C. As análises do microbioma foram realizadas através do serviço ZymoBIOMICS® Targeted Sequencing Service for Microbiome Analysis pela empresa Zymo Research.

2.2. Extração de DNA e sequenciamento

A extração de DNA foi realizada utilizando os kits ZymoBIOMICS® -96 MagBead DNA (ZymoResearch, Irvine, CA) ou ZymoBIOMICS® DNA Miniprep, através de uma plataforma de extração automatizada. A identificação do metagenoma foi realizado com 10% PhiX *spike-in* usando Sequenciamento de Nova Geração através do sistema Illumina® MiSeq™, com o kit de reagente v3 (600 ciclos). Inicialmente, foram construídas bibliotecas de DNA específicas para ambos os grupos. Para bactérias, houve o sequenciamento do gene do RNA ribossomal 16S usando o kit Quick-16S™ NGS Library Prep Kit (ZymoResearch, Irvine, CA), no qual primers 16S foram utilizados para amplificar a região V3-V4 do gene. Na identificação dos fungos, objetivou-se à amplificação completa da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) usando o mesmo kit, entretanto com a utilização de primers para ITS2. Controles negativos e positivos foram utilizados durante todos os processos.

2.3. Análise de bioinformática

Os resultados do sequenciamento foram utilizados para atribuição de relações filogenéticas, visualização da composição das amostras, alpha- e beta-

análise de diversidade. Variantes de sequência de amplicon (ASVs) foram inferidos a partir das leituras usando a pipeline DADA2. Esses foram utilizados para gerar gráficos da análise de coordenadas principais 3D (PCoA), usando uma matriz de distância da composição de espécies pelo método Bray-Curtis. Os resultados foram reanalisados pelo alinhamento das sequências amplificadas usando o banco de dados da coleção de nucleotídeos do National Center for Biotechnology (NCBI) e a ferramenta *nucleotide* BLAST.

O software MEGA v. 10.1.7 foi utilizado para o alinhamento, construção e visualização da árvore filogenética. O alinhamento das sequências foi realizado com o uso da ferramenta ClustalW, e a árvore filogenética usando o método Bootstrap com 1000 replicações, a partir do método estatístico Neighbor-joining. As árvores circulares foram usadas como *templates* para as figuras finais, as quais tiveram esquemas e cores adicionados através do software GIMP v.2.10.18. A composição microbiana para cada amostra foi avaliada através do software GraphPad Prism 7, bem como a construção dos gráficos circulares para exposição dos níveis e organizações filogenéticas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise através de bioinformática permitiu a identificação dos microbiomas das amostras, foi possível observar 60 gêneros e 140 espécies diferentes de bactérias, e ainda 4 isolados os quais foi possível somente a identificação a nível de família. As bactérias com maior prevalência em nosso estudo foram *Lactobacillus acetotolerans* (em 60% das amostras), *Pediococcus damnosus* (35%) e *Ralstonia picketti-mannitolilytica* (35%). Na identificação de fungos, foram observados 19 gêneros e 26 espécies, dentre os quais os mais prevalentes nas amostras foram as leveduras *Brettanomyces bruxellensis* (75%) e *Saccharomyces cerevisiae* (65%). Ainda, além das leveduras identificadas, foi possível observar a presença do material genético de cogumelos (ex: *Agaricus iranicus*) e bolores (ex: *Capnodiales* sp.).

Como observado por BOKULICH et al. (2012) e SPITAELS et al. (2014), que descrevem microrganismos associados às fases da fermentação espontânea de cervejas (fermentação, acidificação e maturação), também foram identificados em nosso trabalho os DNAs de bactérias da família Enterobacteriaceae, representando 26.36% das bactérias identificadas. De grande importância para cervejas *sour*, foram observados *Lactobacillus* spp. e *Pediococcus* spp., e bactérias ácido-lácticas dos gêneros *Leuconostoc* spp., *Weissela* spp. e Aerococcus spp.

Foi identificada a presença de 4 espécies diferentes de *Brettanomyces* spp., as quais têm grande influência nos *flavors* de *Lambics*, *English Ales* e *American Coolship Ales* (DE ROOS; DE VUYST, 2019). A origem dessas leveduras selvagens está ligada tanto a inoculação de *starters* comerciais quanto a sua presença no microambiente em que essas cervejas foram produzidas, representando sua grande adaptabilidade a fermentação cervejeira. A presença desse microrganismos no interior dos barris de madeira, nos quais as cervejas foram maturadas e/ou fermentadas, pode ser a fonte de inoculo dessas

leveduras, como observado por DE ROOS et al. (2019), o que também pode explicar a presença de leveduras como *Pichia* spp., *Wickerhamomyces* spp., *Debaryomyces* spp., e fungos como *Penicillium* spp. no metagenoma identificado de cada amostra.

4. CONCLUSÕES

Em conclusão, foi possível determinar o microbioma de cervejas produzidas por fermentação mista, fornecendo informações importantes para que a indústria cervejeira possa conhecer e entender as reações e resultados dos processos empregados em suas fábricas.

Como perspectivas futuras, iremos combinar as culturas obtidas e acompanhar a evolução da população microbiana através do curso da fermentação para determinar quais espécies são dominantes, que características determinam na fermentação que auxiliará no desenvolvimento de novas culturas personalizadas para produção de cervejas de fermentação mista.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOKULICH, N. A.; BAMFORTH, C. W.; MILLS, D. A. Brewhouse-resident microbiota are responsible for multi-stage fermentation of American coolship ale. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, 2012.

DE ROOS, J.; DE VUYST, L. Microbial acidification, alcoholization, and aroma production during spontaneous lambic beer production. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 1, p. 25–38, 2019.

DE ROOS, J.; VAN DER VEKEN, D.; DE VUYST, L. The interior surfaces of wooden barrels are an additional microbial inoculation source for lambic beer production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 1, p. 1–18, 2019.

FARIA-OLIVEIRA, F. et al. The Role of Yeast and Lactic Acid Bacteria in the Production of Fermented Beverages in South America. In: **Food Production and Industry**. [s.l.] InTech, 2015. v. ip. 13.

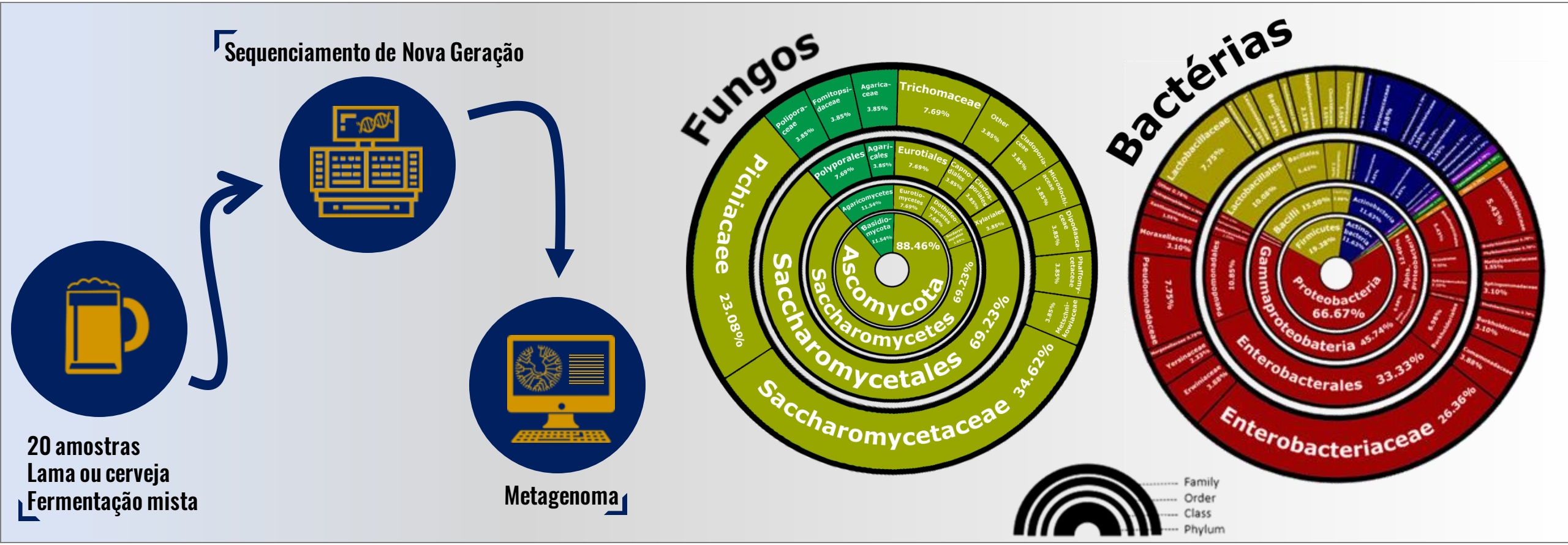
SPITAELS, F. et al. The microbial diversity of traditional spontaneously fermented lambic beer. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

VRIESEKOOP, F. et al. 125th Anniversary review: Bacteria in brewing: The good, the bad and the ugly. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 118, n. 4, p. 335–345, 2012.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

METAGENOMA DE CERVEJAS DE FERMENTAÇÃO MISTA

RENAN EUGÊNIO ARAUJO PIRAINE[1]; DAVID J. SUN[2]; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE[3]; MATTHEW L. BOCHMAN[4]



AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR DE *Spirulina* sp. LEB 18 CULTIVADA COM SUPLEMENTAÇÃO DE GLICEROL

NATÁLIA MADRUGA ARRIEIRA[1]; KAROLINE PEREIRA RODRIGUES[2];GABRIELA BARCELLOS CURI LEAL[3]; JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA[4]; ANA PRISCILA CENTENO DA ROSA[5]

[1]*Universidade Federal do Rio Grande - FURG – nataliamadruga.arrieira@gmail.com*
[2]*Universidade Federal do Rio Grande - FURG – karool.pereira06@gmail.com*
[3]*Universidade Federal do Rio Grande - FURG – gabyrgleal560@gmail.com*
[4]*Universidade Federal do Rio Grande - FURG – jorgealbertovc@*gmail*.com*
[5]*Universidade Federal do Rio Grande - FURG – ana.centeno@furg.br*

1. INTRODUÇÃO

Para o crescimento celular microalgal acelerado é necessário um meio de cultivo rico em nutrientes e sais, além disso, fatores físico-químicos e biológicos tais como temperatura, pH, luz e concentração de substrato influenciam no crescimento desses micro-organismos, sobretudo, a luz e a quantidade de carbono disponível no meio (MATA et al., 2010). Tendo em vista a importância da fonte de carbono nos meios de cultivo e o custo elevado destas nos meios tradicionais, cada vez mais se busca por fontes alternativas e menos onerosas, como o glicerol, subproduto da produção de biodiesel, sendo utilizado como fonte de carbono orgânico em cultivos mixotróficos a fim de estimular a produção de lipídeos, proteínas e biomassa (DE MORAIS et al., 2018).

Além disso, a utilização de fotobiorreatores para o cultivo microalgal apresenta vantagens em relação a sistemas abertos, eles são adequados para cultivos em condições ambientais não controladas (*outdoor*), possuem ampla superfície de exposição à luz e propiciam a produção de uma alta quantidade de biomassa, além de reduzirem o risco de contaminação e facilitarem o controle do processo (BAICHA et al., 2016). Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar o crescimento celular de *Spirulina* sp. LEB 18 em cultivo mixotrófico *outdoor* utilizando o glicerol como fonte de carbono orgânico, em fotobiorreatores fechados, utilizando a luz solar para a fotossíntese.

2. METODOLOGIA

A microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foi cultivada em meio Zarrouk modificado ZARROUK (1966), com fonte de carbono reduzida em 50% suplementado com glicerina PA 0,01M. Os ensaios foram realizados *outdoor* e tiveram a duração de 7 dias. Foram realizados três ensaios em duplicata em fotobiorreatores tipo Erlenmeyer de 1 L com 0,8 L de meio. O ensaio controle não teve adição de glicerina, no ensaio em batelada a glicerina foi adicionada no início do cultivo na concentração de 0,05 $g.L^{-1}$ e, por fim, nos ensaios em batelada alimentada além da adição inicial de glicerina, a cada três dias de cultivo adicionou-se mais 0,05 $g.L^{-1}$ da fonte de carbono orgânico. A concentração inicial de células dos cultivos foi de 0,3 $g.L^{-1}$.

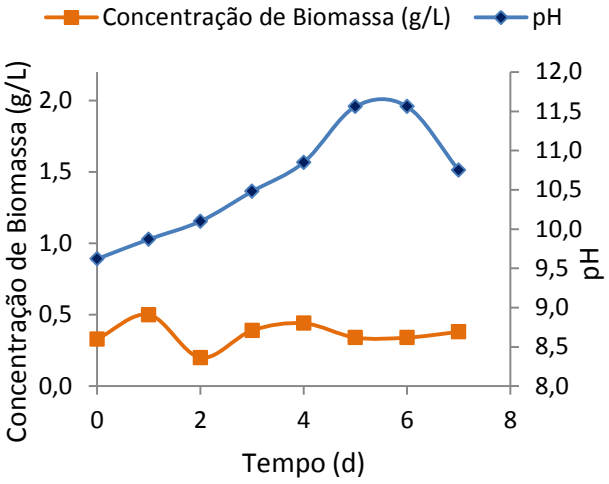
Os ensaios foram acompanhados diariamente, com análises de pH, concentração de biomassa por densidade óptica a 670nm em

espectrofotômetro, temperatura máxima e mínima e luminância. Neste trabalho foram determinados os seguintes parâmetros: concentração celular máxima ($X_{máx}$) e produtividade máxima ($P_{máx}$) de cada ensaio.

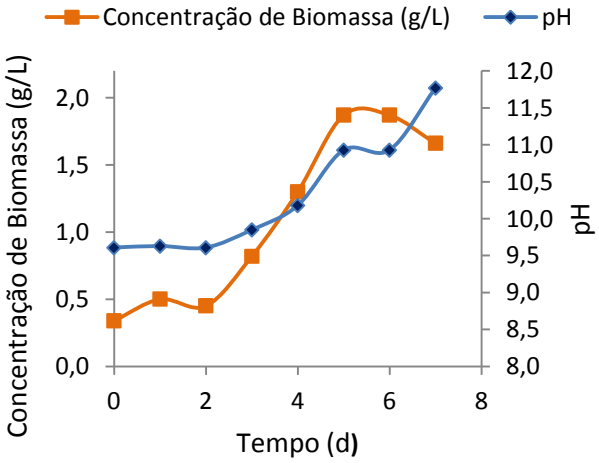
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As curvas de concentração de biomassa e pH de cada ensaio realizado estão representadas na Figura 1.

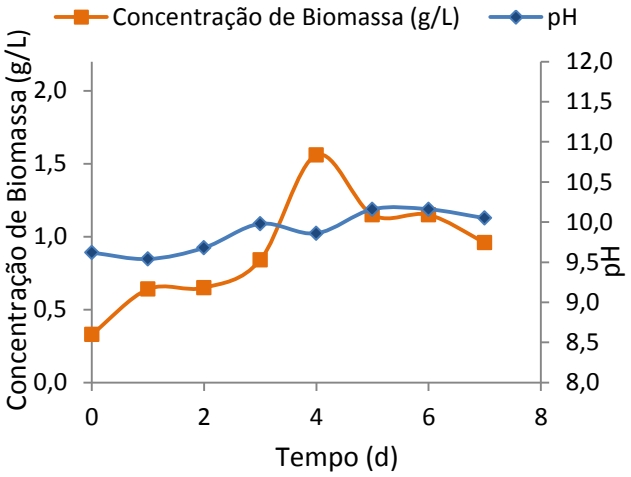
Figura 1- Curvas de concentração de biomassa e pH de *Spirulina* sp. LEB 18 nos cultivos controle (a), batelada (b) e batelada alimentada (c)



(a)



(b)



(c)

Analisando os gráficos apresentados é possível perceber que as concentrações de biomassa dos cultivos em batelada e batelada alimentada foram maiores quando comparadas àquelas do cultivo controle. Os valores de concentração celular máxima ($X_{máx}$) e produtividade máxima ($P_{máx}$) estão

apresentados na Tabela 1. Segundo DE MORAIS et al. (2018) em seus estudos, a adição de glicerol ao meio de cultivo promove um aumento na relação carbono/nitrogênio, o que resulta em maiores concentrações celulares, salienta-se também que quando o meio fornece uma fonte de carbono reduzida para o desenvolvimento microalgal a inibição do crescimento das células pode ocorrer. Além disso, por ser um cultivo *outdoor*, a intensidade luminosa não foi constante e esse fato pode ter influenciado no crescimento de biomassa do ensaio controle. Os valores de luminância variaram de 460 a 1352 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} ao longo dos sete dias de cultivo.

Tabela 1- Valores de concentração celular máxima ($X_{máx}$) e produtividade máxima ($P_{máx}$) de cada ensaio

Ensaio	$X_{máx}$ ($g.L^{-1}$)	$P_{máx}$ ($g.L^{-1}.d^{-1}$)
Controle	0,50	0,167
Batelada	1,87	0,305
Batelada Alimentada	1,56	0,311

Uma das vantagens dos cultivos mixótroficos é não apresentar problemas quanto à perda de biomassa na fase escura da fotossíntese BAICHA et al. (2016), pois em cultivos com uma fonte adicional de carbono orgânico o crescimento não depende apenas da luz, portanto na fase escura da fotossíntese em que alguns compostos orgânicos produzidos são consumidos a fonte de carbono orgânico do meio de cultivo funciona como reserva, reduzindo assim a perda de biomassa. Isso explica as maiores concentrações de biomassa nos cultivos em batelada e batelada alimentada. Ainda, ZHAN et al. (2017) ressaltam que cultivos mixotróficos apresentam vantagens como maior taxa de crescimento, maior concentração de biomassa e maior acúmulo lipídico, além de proporcionar a energia necessária para a produção de pigmentos e fitoquímicos.

Quanto aos valores de pH apresentados é possível observar que em todos os cultivos ocorreram variações dos valores ao longo do tempo. Segundo FREITAS et al. (2012) as variações de pH nos cultivos de microalgas podem ser derivadas do consumo de substratos e da degradação de alguns metabólitos produzidos, corroborando esta ideia TREVISAN et al. (2013) citam em seus estudos que o crescimento da biomassa de microalgas promove a remoção de compostos de carbono responsáveis pela acidificação do meio, ocasionando assim o aumento significativo do pH, como pode ser percebido nos gráficos apresentados.

Portanto, a utilização do glicerol como fonte de carbono orgânico nos cultivos foi efetiva, aumentando a concentração de biomassa e proporcionando a valorização de um resíduo industrial.

4. CONCLUSÕES

O trabalho colabora com os estudos sobre fontes de carbono alternativas e menos onerosas para cultivos mixotróficos de microalgas,

comprovando que o glicerol pode ser utilizado para aumentar a concentração de biomassa em cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAICHA, Z.; SALAR-GARCÍA, M. J.; ORTIZ-MARTÍNEZ, V. M.; HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, F. J., DE LOS RÍOS, A. P.; Labjar, N.; LOTFI, E.; ELMAHI, M. A critical review on microalgae as an alternative source for bioenergy production: A promising low cost substrate for microbial fuel cells. **Fuel Processing Technology**, Amsterdam, v.154, p.104–116, 2016.

DE MORAIS, E. G.; DRUZIAN, J. I.; NUNES, I. L.; DE MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Glycerol increases growth, protein production and alters the fatty acids profile of *Spirulina (Arthrospira)* sp LEB 18. **Process Biochemistry**. Amsterdam, v.76, p.40-45, 2018.

FREITAS, B. C. **Cultivo de microalgas utilizando pentoses como fonte de carbono**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Curso de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v.14, n.1, p.217–232, 2010.

TREVISAN, E.; NETO, M L.; MORO, P.; HOSHINO, S. O.; ARROYO, P. A. Avaliação do pH em cultivo de microalga *Chlorella vulgaris*. In: **VIII EPCC – ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA CESUMAR**. Maringá, 2013. **Anais...** Maringá: Editora CESUMAR, 2013.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une cyanophycée: Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima Geitler***. 1996. Ph.D. Thesis, University of Paris.

ZHAN, J.; RONG, J.; WANG, Q. Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v.42, n.12, p.8505–8517, 2017.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR DE *Spirulina* sp. LEB 18 CULTIVADA COM SUPLEMENTAÇÃO DE GLICEROL

NATÁLIA MADRUGA ARRIEIRA[1]; KAROLINE PEREIRA RODRIGUES[2]; GABRIELA BARCELLOS CURI LEAL[3]; JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA[4], ANA PRISCILA CENTENO DA ROSA[5]

Cultivos:
Duração de 7 dias
Duplicata



Controle: Meio Zarrouk
Com 50% da fonte de carbono



Batelada: Meio Zarrouk
Com 50% da fonte de carbono
+ 0,05 g.L^{-1} de glicerol



Batelada Alimentada: Mesmas condições do cultivo em batelada + 0,05 g.L^{-1} a cada 3 dias de cultivo

Acompanhamento:
pH, Concentração de biomassa, Intensidade luminosa, temperaturas máx e mín

Avaliação dos parâmetros:

- Concentração celular máxima ($X_{máx}$)
- Produtividade máxima ($P_{máx}$)

Resultados:

Maior $X_{máx}$ -> 1,87 g.L^{-1} (Batelada)

Maior $P_{máx}$-> 0,31 g.L^{-1}.d^{-1} (Batelada alimentada)

A utilização do **glicerol** proporcionou:

- Aproveitamento de um resíduo industrial
- Aumento da concentração de biomassa

BIOTECNOLOGIA E MEIO AMBIENTE: UM CONCISO DIAGNÓSTICO SOBRE A DEGRADAÇÃO DE POLIURETANOS

PATRICIA DE FRANÇA MARINS[1]; ALEX BATISTA TRENTIN[2]; REINALDO YOSHIO MORITA[3]

[1]Universidade Tecnológica Federal do Paraná – marinsp@outlook.com.br
[2]Universidade Tecnológica Federal do Paraná – a.trentinx@gmail.com
[3]Universidade Tecnológica Federal do Paraná – rmorita@utfpr.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A sustentabilidade econômica condiz com o equilíbrio entre a economia, a responsabilidade ambiental e a qualidade de vida. Esses conceitos aplicados aos materiais poliméricos, como os elastômeros e as espumas de poliuretano (PU), apresentam dois escopos biotecnológicos: a síntese de polímeros usando precursores alternativos e a busca de rotas eficientes de degradação. Essas soluções são uma abordagem biotecnológica para a mitigação dos desafios associados ao gerenciamento e tratamentos dos resíduos plásticos gerados pós-consumo, por meio de quatro cenários alternativos: a redução dos resíduos plásticos já existentes através da degradação por meio de microrganismos e enzimas; a troca de reagentes na síntese do polímero por recursos renováveis e produzindo materiais plásticos com caráter biodegradável; a conversão em novos produtos com valor agregado; e a substituição dos materiais plásticos convencionais por biocompósitos e biopolímeros (SIMÓN et al., 2018).

Os primeiros estudos sobre a degradação microbiana de PU demonstram a capacidade de fungos e bactérias crescerem na superfície do polímero. Posteriormente, foi estudado a identificação de genes e enzimas que contribuem para a degradação desses, sendo que, em um desses trabalhos foi purificada a enzima esterase, a partir do fungo *Curvularia senegalesis,* identificado como o responsável pela clivagem das ligações de ésteres nos segmentos flexíveis do PU (CRABBE et al., 1994; RU; HUO; YANG, 2020). Outros pesquisadores purificaram as proteases, esterases e lipases de bactérias e descobriram que essas apresentam capacidade hidrolítica de emulsificar o PU. Embora essas enzimas tenham sido capazes de degradar rapidamente o PU poliéster emulsionado, clivando as ligações éster nos segmentos de polióis do poliéster, elas demonstraram baixa capacidade de degradação de substratos sólidos de PU, como filmes, espumas e elastômeros. Os produtos de degradação não foram identificados e o mecanismo bioquímico ainda não é claro (RU; HUO; YANG, 2020; SCHMIDT et al., 2017).

A degradação biológica do PU, ou seja, a degradação por meio de microrganismos, é uma área de pesquisa promissora, uma vez que contribui significativamente para o design de materiais sustentáveis sensíveis a degradação. Desta forma, há um número crescente de estudos sobre as rotas enzimáticas e de microrganismos capazes de degradar essas cadeias poliméricas, além disso, para estas análises são observadas numerosas ferramentas analíticas que se alteram conforme o material e entidade biológica pesquisada. O desenvolvimento de novas técnicas analíticas possibilitam melhor entendimento sobre os mecanismos de degradação dos PUs (SÁNCHEZ, 2020).

A biodegradação de polímeros pode ser definida como uma degradação de materiais poliméricos por entidades biológicas, quando ocorre a partir de microrganismos e apresenta um conjunto de etapas para que ocorra esse processo. Primeiramente, a degradação dos materiais poliméricos pós-uso e descartados ocorre pela ação de fatores abióticos, como a ação da luz, da água, da pressão, causando a degradação física do material. A etapa seguinte, na presença do meio biológico (fungos, bactérias, actinomicetos), há a adesão e o crescimento destes seres na superfície do material fisicamente degradado. A partir disso, ocorre a etapa de despolimerização enzimática, pois a secreção das enzimas sobre o material promove reações de hidrólise e oxidação, causando a clivagem das cadeias poliméricas transformando-as em oligômeros e monômeros. A etapa enzimática pode ocorrer por incontáveis vias e também pode ser realizada *in vitro*, independente da ação microbiana. Quando as cadeias dos polímeros se tornam moléculas de baixa massa molar, são assimiladas e mineralizadas pelos microrganismos (MAGNIN et al., 2020).

Diante do exposto, considerando a importância da degradação de materiais de PU, o presente trabalho tem como objetivo apresentar uma análise sistemática da literatura científica global sobre essa temática, de modo a analisar e discutir as inovações e avanços no que tange o tema.

2. METODOLOGIA

Com o propósito de apresentar um panorama de conhecimentos a respeito dos estudos que foram realizados sobre a degradação biológica de poliuretano, foi realizado uma revisão sistemática, através da metodologia *Methodi Ordinatio*. Neste, as publicações da temática são apresentados os trabalhos mais relevantes, de acordo com o índice *InOrdinatio*, o qual relaciona o fator de impacto (FI) do periódico, ano de publicação e número de citações (PAGANI; KOVALESKI; RESENDE, 2015).

A busca dos trabalhos foi realizada na base de dados do *ISI Web of Science (WoS)*, pois esta apresenta números significativos de artigos e maior consistência nas buscas. A combinação de palavras utilizadas foram "*Biodegradation",* o operador *booleano* AND e "*Polyurethane"*, filtrada na principal coleção da WoS, nos períodos de publicações de 2015 a 2020, seguidas da seleção de arquivos que estudaram ou avaliaram a degradação de PU, para que todos esses se enquadrassem na temática delimitada.

Os resultados da busca foram importados para o software *Mendeley,* seguidas da exportação dos dados para o software de gerenciamento bibliográfico *JabRef* e posteriormente importadas para o software Microsoft Excel, organizados em planilha e adicionadas as demais informações necessárias para uso do método *Methodi Ordinatio.* As análises que demandam o desenvolvimento de redes de conexão e indicadores referentes a análise cienciométrica foram realizadas no Software CiteSpace.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A busca nas bases de dados WoS (principal coleção) apresentou inicialmente 356 registros. Destes, 70 artigos estavam dentro da temática de biodegração de poliuretanos, os quais foram organizados em ordem crescente

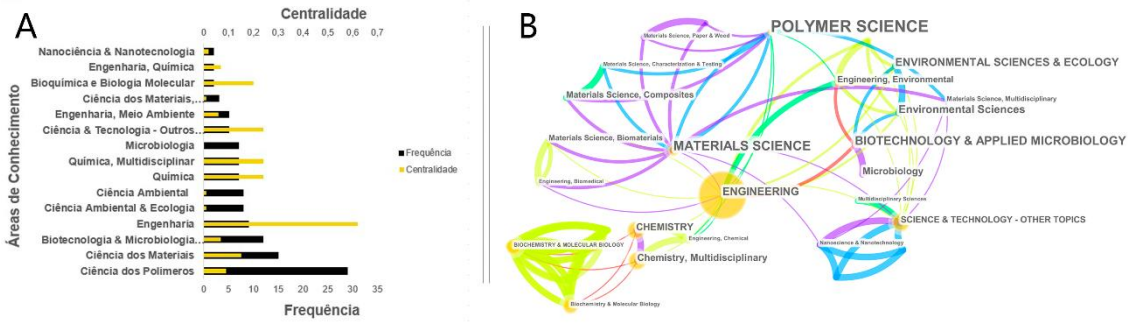
de acordo com o índice *InOrdinatio*. É possível inferir que os artigos mais antigos, de 2017, tenderam as primeiras posições no ranqueamento, isso se deve ao fato de terem mais citações que as publicações mais recentes.

O artigo com a melhor pontuação foi a *Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we?* publicada em 2017, na revista *Microbial Biotechnology* com FI de 5,328 (2020), apresentando 74 citações e valor de *InOrdinatio* de 144,01. Este trabalho é uma revisão de literatura com a temática de biocatalisadores microbianos envolvidos na degradação de poliuretano, poliestireno (PS), polietileno (PE), plástico sintético e poli(tereftalato de etileno) (PET). O objetivo foi apresentar os desafios e as inovações em relação as aplicações de hidrolases para poliéster (WEI; ZIMMERMANN, 2017).

O segundo artigo foi o *Degradation and stabilization of polyurethane elastomers*, publicada em 2019, na revista *Progress in Polymer Science* com FI de 22,620, apresenta 23 citações e valor de *InOrdinatio* de 113,02. Este trabalho também é uma revisão, no entanto, com a temática na degradação de elastômeros de PU sob a influencia de vários fatores ambientais, abrangendo meios de interação entre a química e a engenharia para melhorar a resistência à degradação (XIE et al., 2019).

Seguindo a ordem, foi o *Challenges associated with plastic waste disposal and allied microbial routes for its effective degradation: A comprehensive review*, publicada em 2019, na revista *Journal of Cleaner Production,* com FI de 7,246, apresenta 22 citações e valor de *InOrdinatio* de 112,01. Sendo no formato de revisão que apresenta estudos de biodegração por meio de espécies microbianas. Os objetivos foram discutir o gerenciamento de plásticos, as melhores vias de biodegração e os impactos causados as matrizes ambientais (MOHARIR; KUMAR, 2019). A Figura 1A apresenta a relação entre a frequência de publicações e a centralidade.

Figura 1. A) As principais áreas de conhecimento em termos de centralidade e a frequência de publicação. B) Redes de áreas de conhecimento. Círculos amarelos representam a centralidade.



É possível verificar que há mais publicações na categoria de Ciências de Polímeros, embora a maior centralidade está presente na Engenharia. Isto é explicado porque o objeto de estudo foi um polímero, assim sendo evidente que haverá mais publicações na área de Ciências de Polímeros, seguida por Ciência dos Materiais e Biotecnologia e Microbiologia Aplicada.

Entretanto, nas publicações de biodegradação de poliuretanos, as áreas de conhecimentos que mais se conectam estão na Engenharia, uma vez que

esta apresenta áreas multidisciplinares. Na Figura 1B, é observado as interações entre as áreas de conhecimento através do tamanho das conexões que indica a centralidade. As correlações entre as áreas citadas na figura se apresentam de forma clara, em que o tamanho dos títulos das áreas indica a frequência de publicação. Desta forma, ficou evidente a maior contribuição das duas áreas, Ciência de Polímeros e Ciências dos Materiais.

4. CONCLUSÕES

A revisão sistemática possibilitou uma análise minuciosa sobre os estudos referentes a biodegradação e síntese de compostos de poliuretano, alternativas de vias metabólicas e redução dos impactos negativos sobre as matrizes ambientais. O levantamento bibliográfico apresentado neste trabalho foi consistente, contribuiu para elaboração de novos temas de pesquisas, com o intuito de contribuir para o desenvolvimento científico e geração de conhecimentos. Por fim, este estudo reafirma a importância dos estudos sobre as vias e métodos de biodegradação de poliuretanos como forma de destinação dos resíduos pós-consumo e redução do impacto causado as matrizes ambientais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CRABBE, J. R. et al. Biodegradation of a colloidal ester-based polyurethane by soil fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 33, n. 2, p. 103–113, 1994.

MAGNIN, A. et al. Evaluation of biological degradation of polyurethanes. **Biotechnology Advances**, v. 39, p. 107457, 2020.

MOHARIR, R. V.; KUMAR, S. Challenges associated with plastic waste disposal and allied microbial routes for its effective degradation: A comprehensive review. **Journal of Cleaner Production**, v. 208, p. 65–76, 2019.

PAGANI, R. N.; KOVALESKI, J. L.; RESENDE, L. M. Methodi Ordinatio: a proposed methodology to select and rank relevant scientific papers encompassing the impact factor, number of citation, and year of publication. **Scientometrics**, v. 105, n. 3, p. 2109–2135, 2015.

RU, J.; HUO, Y.; YANG, Y. Microbial Degradation and Valorization of Plastic Wastes. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. April, p. 1–20, 2020.

SÁNCHEZ, C. Fungal potential for the degradation of petroleum-based polymers: An overview of macro- and microplastics biodegradation. **Biotechnology Advances**, v. 40, p. 107501, 2020.

SCHMIDT, J. et al. Degradation of polyester polyurethane by bacterial polyester hydrolases. **Polymers**, v. 9, n. 2, p. 65, 2017.

SIMÓN, D. et al. Recycling of polyurethanes from laboratory to industry, a journey towards the sustainability. **Waste Management**, v. 76, p. 147–171, 2018.

WEI, R.; ZIMMERMANN, W. Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we? **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1308–1322, 2017.

XIE, F. et al. Degradation and stabilization of polyurethane elastomers. **Progress in Polymer Science**, v. 90, p. 211–268, 2019.

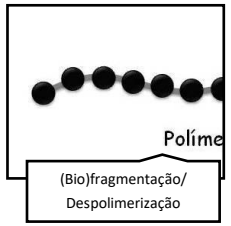
VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA
Graduação
PPGB Programa de Pós Graduação em Biotecnologia

BIOTECNOLOGIA E MEIO AMBIENTE: UM CONCISO DIAGNÓSTICO SOBRE A DEGRADAÇÃO DE POLIURETANOS

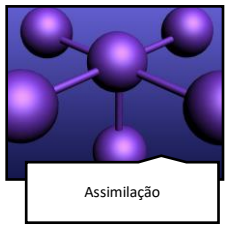
PATRICIA DE FRANÇA MARINS[1]; ALEX BATISTA TRENTIN[2]; REINALDO YOSHIO MORITA[3]

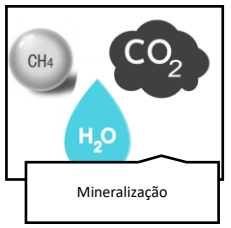

Poliuretano


Efeitos Abióticos + Bióticos = (Bio)deterioração



(Bio)fragmentação/ Despolimerização

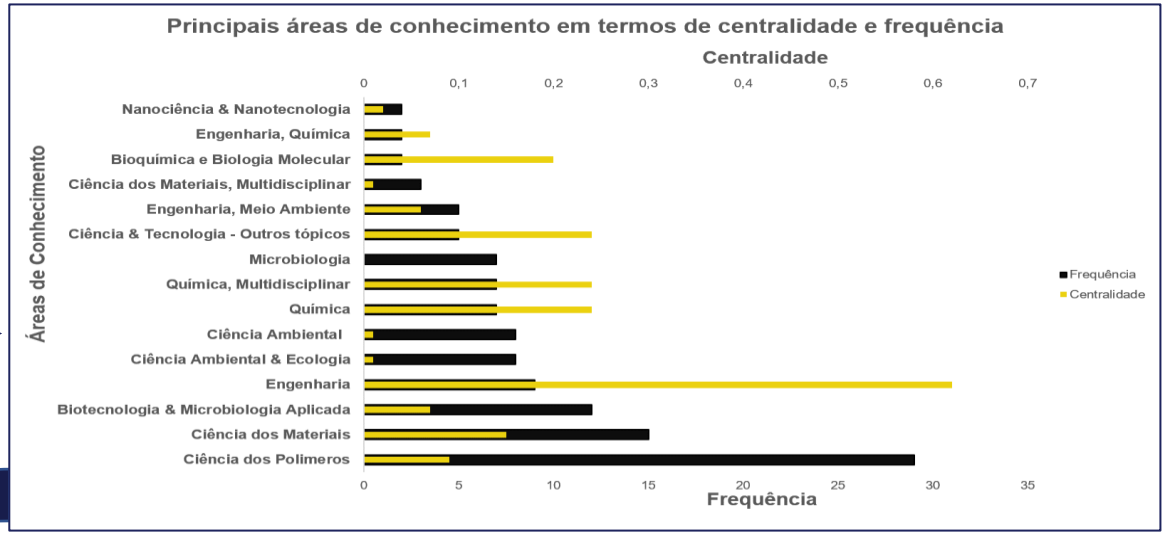

Assimilação

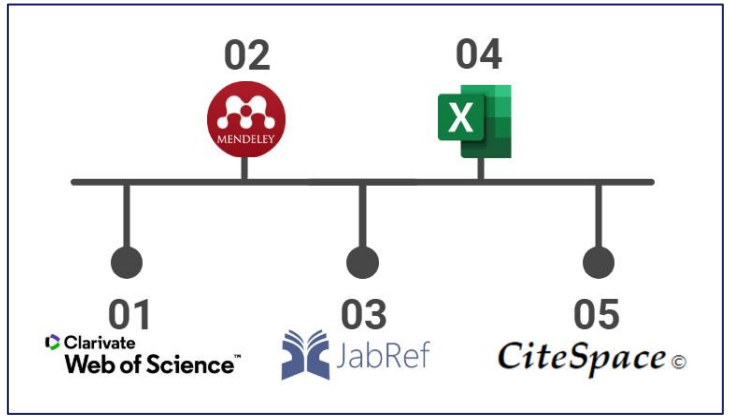


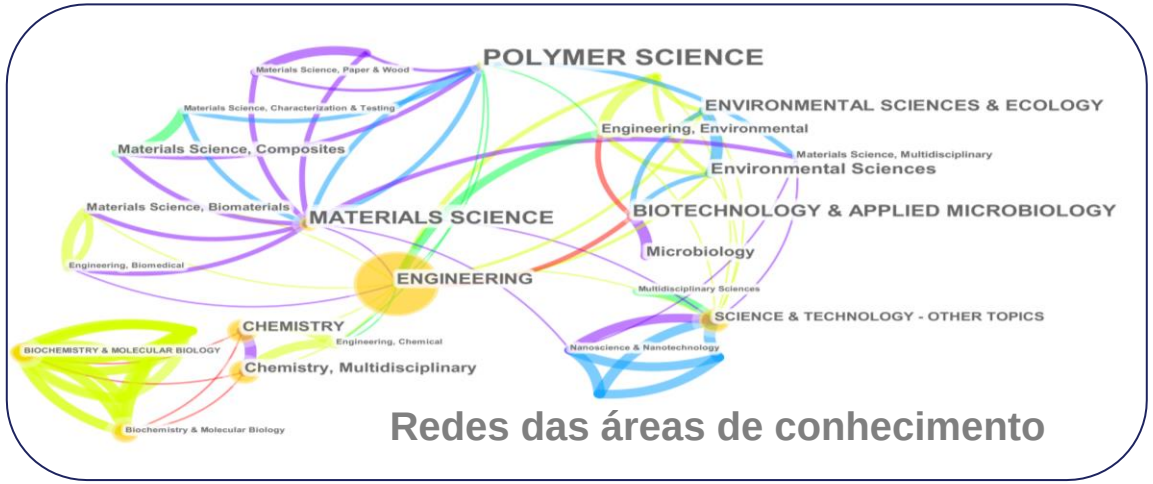
Mineralização

Ranqueamento dos principais estudos

Autor	*In Ordinatio*
Wei, R., et al.	144,01
Xie, F., et al.	113,02
Moharir, R.V., et al.	112,01







Redes das áreas de conhecimento

AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL EM BIVALVES APÓS EXPOSIÇÃO A UMA SUBSTÂNCIA NEUROTÓXICA, UTILIZANDO O MARISCO BRANCO *Amarilladesma mactroides* COMO MODELO BIOLÓGICO

ADRIANO RAYOL DA SILVA[1], RAFAEL GERHARDT[2], JULIANO DA SILVA BARRETO[3], SAMANTHA ESLAVA GONÇALVES MARTINS[4], JULIANA ZOMER SANDRINI[5]

[1]*Universidade Federal do Rio Grande, Avenida Itália, km 8, bairro Carreiros, Rio Grande, RS, Brasil – adrianorayol@outlook.com*

[2]*Universidade Federal do Rio Grande, Avenida Itália, km 8, bairro Carreiros, Rio Grande, RS, Brasil – rafaelgerhardt2006@yahoo.com.br*

[3]*Universidade Federal do Rio Grande, Avenida Itália, km 8, bairro Carreiros, Rio Grande, RS, Brasil – jubarretofurg@gmail.com*

[4]*Norwegian Institute for Water Research (NIVA) – Gaustadalléen 21, 0349, Oslo, Norway – samantha.martins@niva.no*

[5]*Universidade Federal do Rio Grande, Avenida Itália, km 8, bairro Carreiros, Rio Grande, RS, Brasil – juzomer@hotmail.com*

1. INTRODUÇÃO

Devido ao problema causado pela contaminação proveniente de atividades antrópicas, a aplicação de ferramentas sensíveis (biomarcadores) têm aumentando nos últimos anos, a fim de identificar a que nível organizacional os contaminantes podem afetar os animais expostos a eles. Neste contexto, o comportamento dos organismos aquáticos frente a contaminação, pode ser utilizado como biomarcador ecotoxicológico de alto nível organizacional. As alterações ocasionadas em organismos-chave após exposição aos xenobióticos, pode interferir no fluxo de transferência de matéria entre os níveis tróficos (efeito cascata), afetando diretamente todo o funcionamento do ambiente (Bonnard et al., 2009).

Bivalves são excelentes modelos biológicos em estudos ecotoxicológicos, devido a sua pouca mobilidade, capacidade de filtrar e incorporar pequenos materiais (biológicos ou não) em suspensão na água (Livingstone, 1991). Entre as diversas espécies de bivalves podemos destacar o *A. mactroides*, que é um bivalve marinho de hábito filtrador suspensivo a depositivoro, podendo viver enterrado de 5 a 30 cm de profundidade, distribuído desde a Ilha Bela (Rio de Janeiro, Brasil) até a província de Buenos Aires na Argentina (Rios, 1994). Devido a estas características, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo para avaliar parâmetros comportamentais (resposta a estímulos mecânicos e enterramento) para moluscos bivalves expostos a contaminantes ambientais, usando o *A. mactroides* como modelo biológico.

2. METODOLOGIA

2.1. COLETA E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Os mariscos na fase juvenil (25,4 ± 2,23 mm) foram coletados na zona de arrebentação interna da Praia do Mar Grosso, localizada no município de São José do Norte - RS, Brasil (32°3’10” S 51°59’26” O). Os animais após coletados, foram acondicionados em caixas plásticas (50 L) com a mesma água do

ambiente, constantemente aerada e transportadas para o laboratório. O sedimento também foi coletado (40 cm de profundidade).

No laboratório, os mariscos foram transferidos para uma caixa de polietileno (1000 L), preenchida com 200 L de água do mar filtrada com salinidade 30. Durante 7 dias, os moluscos foram condicionados nas seguintes condições laboratoriais: oxigenação constante, pH variando de 7,75 ± 0,04, temperatura entre 20,43 ± 0,21 °C, fotoperíodo: 12hC:12hE. A cada dois dias, a água foi renovada (taxa de 50%) e os animais foram alimentados com a diatomácea *Conticribra weissflogii* na concentração de 1,5 x 10^2 células.mL^{-1} por molusco.

2.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram expostos a três diferentes tratamentos: controle solvente (DMSO) que não excedeu a concentração de 0,01% no meio experimental e as duas concentrações do fármaco eserina (250 mM e 500 mM respectivamente), que é conhecido por apresentar efeito inibitório da acetilcolinesterase no bivalve *Mytilus edulis* (Galloway et al. al., 2002).

Os moluscos foram distribuídos aleatoriamente em aquários de vidro (2 L) na densidade de 12 animais/aquário, em triplicata, durante 24 h. Antes do início da exposição, os aquários foram colocados em uma superfície escura, a fim de melhorar o contraste da cor clara da concha dos animais com o fundo transparente dos aquários, facilitando a visualização do pé dos animais durante o teste de toque.

2.3. TESTES COMPORTAMENTAIS

Dentre os parâmetros comportamentais, analisamos a resposta dos mariscos ao estímulo mecânico (toque) 1 h após a exposição aos tratamentos. Com o auxílio de uma ponteira de plástico, os indivíduos (n= 36) de cada tratamento foram tocados individualmente na extremidade dorsal anterior do pé. Cada molusco foi monitorado por vídeo por até 20 s. O tempo de resposta foi analisado através do software Windows Movie Maker, versão 2012.

Além do teste mencionado anteriormente também foi avaliado a atividade de enterramento dos moluscos, sendo a metodologia adaptada de Bonnard et al. (2009) e realizado 24 horas após a exposição. Os mariscos (n= 15 animais/aquário) foram transferidos individualmente e distribuídos aleatoriamente em bandejas plásticas. As bandejas foram preenchidas com 3 cm de sedimento obtido do local da coleta, umedecido com 750 mL de água do mar filtrada. A oxigenação foi mantida durante todo o teste.

Os espécimes foram colocados um a um sobre o sedimento e o teste foi iniciado 1 minuto após a adição do último indivíduo. Esse teste foi realizado durante 3 horas, sendo conduzido da seguinte maneira: o enterramento foi monitorado a cada 1 minuto até atingir 10 minutos, logo após a verificação foi feita a cada 5 minutos até 30 minutos, novamente após 1 hora e depois a cada hora até o final do teste. A partir dos resultados, o TE_{50} (tempo mediano necessário para que 50% dos animais se enterrem completamente no sedimento) foi calculado usando o software Trimmed Spearman-karber (TSK).

2.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

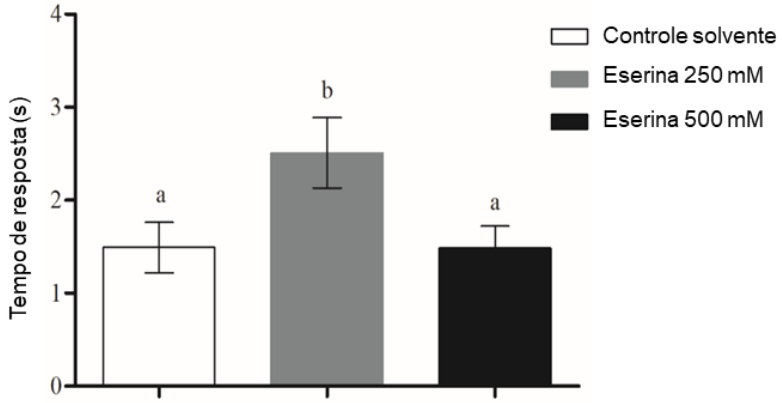
Para a resposta ao estímulo mecânico, foi verificado a normalidade dos dados, os tratamentos foram comparados através do teste T e a hogeneidade de

variância foi verificada através do teste de Levene. Aplicamos a análise de variância paramétrica ANOVA de uma via, seguido pelo teste post-hoc de múltiplas comparações de Newman-Keuls (95% de confibilidade) e as diferenças foram consideradas significativas para o $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram trabalhadas no software Statistic 7.0 (Statsoft, EUA) e as figuras que ilustram as diferenças entre os tratamentos foram plotadas no software GraphPad Prism 5.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontrados para a resposta ao estimulo mecânico demonstram que este parametro foi significativamente alterado ($p < 0,05$) somente após exposição a eserina 250 mM e os mariscos acabram exibindo tempo médio de resposta de 2,51 ± 0,38 s (Figura 1).

Figura 1. Resposta do *A. mactroides* ao estímulo mecânico após exposição à eserina. Os dados são expressos como média ± SEM, as letras diferentes representam diferenças significativas (ANOVA de uma via, $p < 0,05$).



Inicialmente acreditavámos que os bivalves exposto a maior concentração do fármaco iriam ser os mais afetados. Em bioensaios ecotoxicológicos é comum o estabelecimento de curvas concentração-resposta, que demonstram a relação entre a concentração do contaminante em estudo e seus efeitos observados ou não. Para a maioria dos contaminantes já testados, a realção observada é sigmoidal, ou seja, o efeito é maior em altas concentrações (Clotfelter et al., 2004).

De acordo com Clotfelter et al. (2004), esta abordagem de efeito sigmoidal é funcional quando a toxicidade do composto em estudo exibe relação monotônica entre a sua contração e efeito. Porém, a maioria dos contamiantes emergentes, apresentam resultados contrários aos encontrados por contamiantes cujo efeitos apresentam-se bem mais elucidados. Isso se deve ao fato de que essa classe de contaminantes apresentam efeito pronunciado mesmo em baixas concentrações (não-monôtonico). Em nosso estudo, a eserina pode ter apresentado uma toxicidade do tipo não-monotônica para este parâmetro analisado.

Já o tempo de enterramento dos mariscos foi calculado através da TE_{50}, sendo possível observar que os mariscos expostos a eserina, independente da concentração, exibiram menores tempos no enterramento em relação ao controle. Além disso, foi possível observar que a eserina exibiu efeito diferente

entre as concentrações testadas, sendo o retardo do tempo de enterramento menor a medida que as concentrações aumentam (tabela 1).

Tabela 1. Tempo de efeito da eserina (fisostigmina) na atividade de enterramento do *A. mactroides* após 24 h (n= 15 animais/tratamento).

Tratamentos	TE_{50} (min)	Intervalo de confiança
Controle solvente	17.72	12.38–25.36
Eserina - 250 mM	6.48	4.03–10.42
Eserina - 500 mM	2.14	1.37–3.33

. Sergundo Stenton-Dozey e Brown (1994) moluscos bivalves podem utilizar mecanismos de defesa quando expostos a agentes estressores, dentre eles estão o fechamento da concha (mais comum) e o enterramento no substrato. Neste sentido, o enterramento aqui investigado pode ser um mecanismos fisiológico de fuga utilizado pelo marisco, que pode ser acelerado ou inibido na presença de contaminantes ou diante de qualquer mudança que ocorra no ambiente.

4. CONCLUSÕES

Concluímos que o marisco branco após exposição a substância neurotóxica eserina teve os seus parâmetros comportamentais aqui investigados afetados. Além disso, a metodologia tanto de resposta ao estímulo mecânico quanto enterramento se mostraram eficazes para avaliação dos efeitos de contaminantes ambientais, podendo ser utilizada em bioensaios futuros envolvendo outras espécies de bivalves infaunais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BONNARD, M.; ROMEO, M.; AMIARD-TRIQUET, C. Effects of copper on the burrowing behavior of estuarine and coastal invertebrates, the polychaete *Nereis diversicolor* and the bivalve *Scrobicularia plana*. **Hum. Ecol. Risk. Assess.** v. 15, n. 1, p. 11-26. 2009.

CLOTFELTER, E.D.; BELL, A.M.; LEVERING, K.R. The role of animal behaviour in the study of endocrine-disrupting chemicals. **Anim. Behav**. v. 68, n. 4, p. 665-676. 2004.

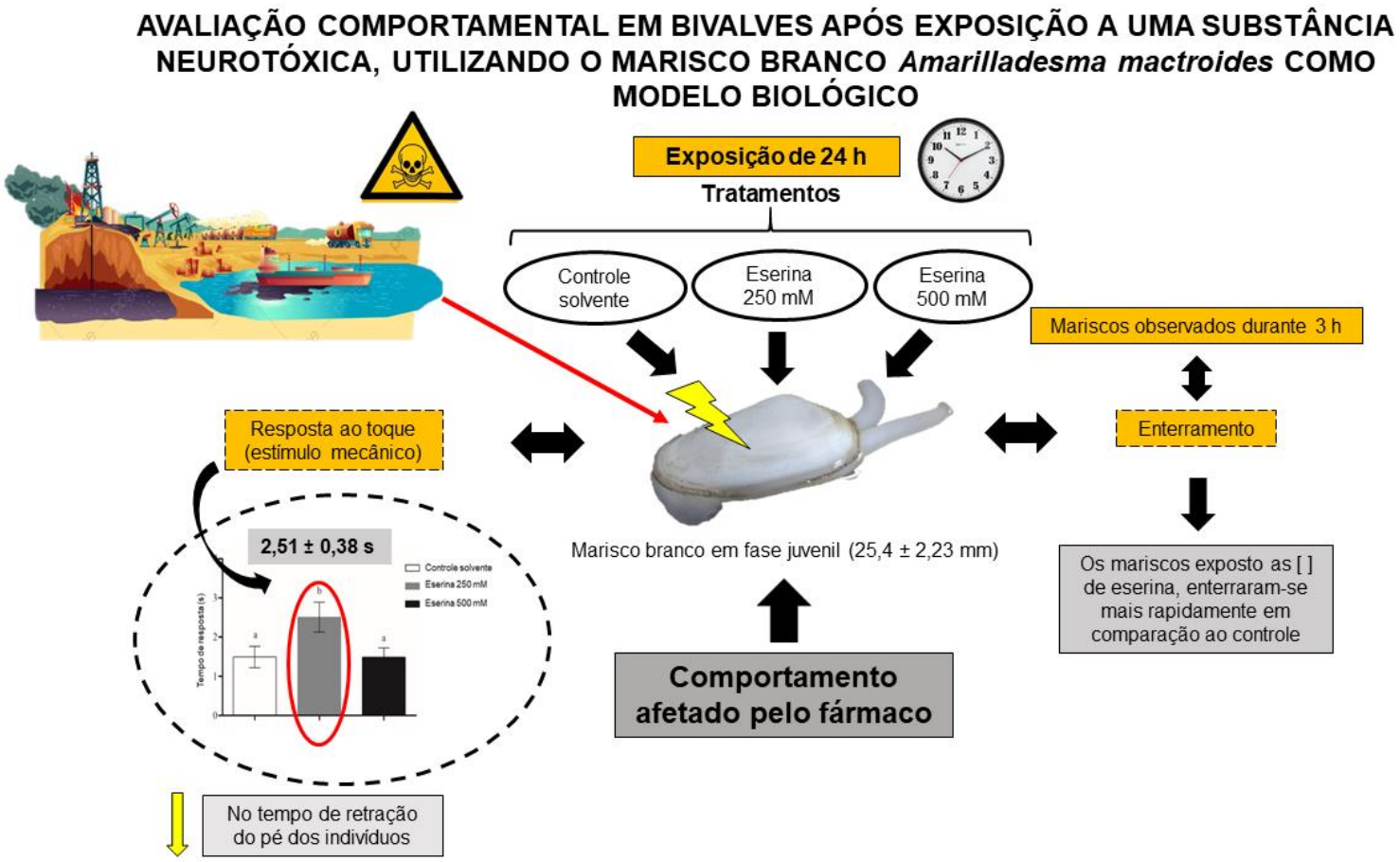
GALLOWAY, T.S.; MILLWARD, N.; BROWNE, M.A.; DEPLEDGE, M.H. Rapid assessment of organophosphorous/carbamate exposure in the bivalve mollusc *Mytilus edulis* using combined esterase activities as biomarkers. **Aquat. Toxicol.** v. 61, n. 3-4, p. 169-180. 2002.

LIVINGSTONE, D.R. Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. In: **Advances in comparative and environmental physiology**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1991. p. 45-185.

RIOS, E.C. Seashells of Brazil. Fundação Universidade de Rio Grande, Museu Oceanográfico, Rio Grande do Sul. 1994. 2ª ed. p. 368.

STENTON-DOZEY, J.M.E.; BROWN, A.C. Short-term changes in the energy balance of *Venerupis corrugatus* (Bivalvia) in relation to tidal availability of natural suspended particles. **Mar. Ecol. Prog**. **Ser.** v. 103, p. 57-57, 1994.

Graphical abstract



AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO MICROBIANA EM ÓLEO DIESEL SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO.

Vithória C. T. Santos, Guilherme R. Freitas, Cristiane A. Ottoni.
vithoriacarolyna@outlook.com

1. INTRODUÇÃO

O crescimento tecnológico e industrial de diferentes setores da sociedade moderna contribuiu com o aumento da poluição, complexidade e toxicidade dos resíduos. Consequentemente, o descarte desses resíduos no meio ambiente, torna a contaminação desses ecossistemas uma preocupação de saúde pública e ambiental (Giovanella, 2019).

Até o presente momento, um dos principais poluentes ambientais ainda é o hidrocarboneto de petróleo. Isso ocorre por conta da sua produção, transporte, processamento químico e distribuição serem fonte de poluição antropogênica. Os impactos ambientais decorrentes de vazamento de derivados de petróleo em solo têm sido considerado preocupante para os órgãos ambientais, uma vez que, deterioram a qualidade das águas subterrâneas (Ławniczak, 2020).

Um desses contaminantes é o óleo diesel (OD), que em contato com o solo se espalha quase que imediatamente e seus hidrocarbonetos se dissolvem e são lixiviados podendo sedimentar, a consequência disso é a contaminação do solo e que pode atingir lençóis freáticos, uma importante fonte de água doce (Cetesb, 2018).

A partir disso para solucionar esse problema, é necessário estudos e tecnologias envolvendo a remediação do solo. A biorremediação é um processo que pode ser definido pela utilização de microrganismos ou enzimas para desintoxicar contaminantes em solos e outros ambientes, é uma técnica promissora do ponto de vista econômico e ecológico (Pietro-Souza, 2019).

Considerando os aspectos descritos, esse estudo teve a intenção de (I) avaliar o potencial de degradação de OD da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* em diferentes condições de cultivo (agitação e estático), (II) relacionar seu rendimento de degradação em um solo bioaumentado e (III) comparar com o desempenho do fungo *Pleurotus ostreatus*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Preparação dos materiais

Todos os materiais e soluções foram esterilizadas na autoclave em 15 minutos a 121 °C. O óleo diesel S-10 foi esterilizado a partir de uma filtração em membrana 0.22 um com auxílio de uma bomba a vácuo.

2.2. Análise da porcentagem celular no cultivo inicial da *P. aeruginosa* em diferentes concentrações de óleo diesel.

A bactéria foi inoculada no meio de cultura LB, onde foi adicionado 0%, 3%, 5%, 7% e 10% de OD, com o auxílio de um espectrofotômetro foi analisada a porcentagem celular da bactéria a cada 24 horas durante 72 horas, em agitação de 200 rpm a 37°C (Pirôllo, 2006).

2.3. Ensaio de biorremediação de óleo diesel em diferentes condições de cultivo.

Os sete frascos Erlenmeyer utilizados como reatores foram preparados com o solo, meio de cultura e OD. Os reatores foram separados em dois grupos, Grupo A – Dinâmico e Grupo B – Estático.

No Grupo A foi inoculado a bactéria *P. aeruginosa* com um solo não estéril (A1), um reator com o solo estéril (A2), um reator com o fungo *P. ostreaus* com solo estéril (A4) e um meio estéril para o branco (A3), em condições de agitação de 200 rpm a 37 °C, durante 4 semanas. No Grupo B foi inoculada a bactéria com um solo não estéril (B1), um reator com o solo estéril (B2) e sem microrganismos para o teste em branco (B3), sem agitação a 37 °C, durante 4 semanas (Mariano, 2006).

2.4. Extração do Óleo Diesel

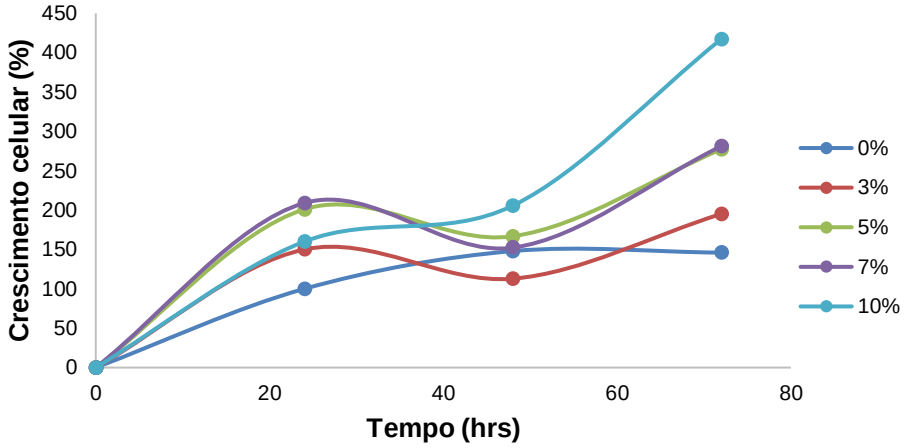
Após as 4 semanas o conteúdo total do solo foi centrifugado para a extração do OD. Para denominar a densidade do OD, foi retirado 1 ml de cada amostra extraída onde foi passada no filtro membrana .22 um e foi pesada na balança para achar sua densidade (Eaton et al, 1995).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Análise da porcentagem celular no cultivo inicial da *P. aeruginosa* em diferentes concentrações de óleo diesel.

Após 72 horas, as amostras 5%, 7% e 10% apresentavam uma maior quantidade de biomassa comparada com o Branco (0%). De acordo com Pirôllo, 2006 o teste de biosurfactante com 30% de óleo diesel no meio foi o mais efetivo, por tanto o meio com 10% foi utilizado como cultura para o ensaio de biorremediação por apresentar um crescimento maior, e consequentemente uma concentração maior de biosurfactante que auxilia na degradação.

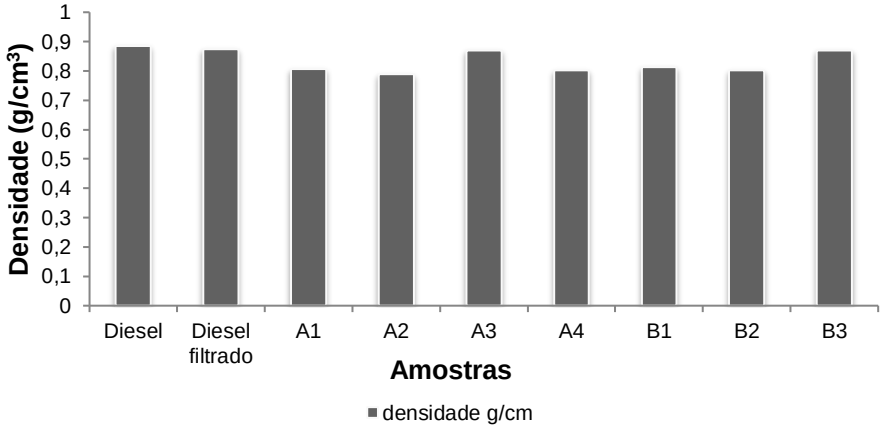
Figura 01 – Efeito de diferentes concentrações de Óleo Diesel na proliferação celular da *P. aeruginosa* após as 72 horas de exposição.



3.2. Resultado final da biorremediação de óleo diesel em diferentes condições de cultivo.

Os meios dinâmicos contendo apenas um microbiano, A1 a *P.aeruginosa* e o A4 o *P. ostreatus,* foram os meios mais efetivos, o estudo de biorremediação de Fernandes, 2020 também conseguiu comprovar que a *Pseudomonas SP.* em agitação obteve uma maior taxa de degradação, já que a mesma promove uma maior difusão de oxigênio nos meios estimulando o metabolismo dos microrganismos.

Figura 02 – Densidades finais das amostras de biodegradação de óleo diesel da bactéria *P. aeruginosa* em meio dinâmico e estático e do fungo *P. ostreatus* em meio dinâmico após as 4 semanas.



A diferença de degradação entre as amostras estéreis e não estéreis também foi visto por Abtahi, 2020, isso se dá pela competição entre a microbiota natural do solo e o microrganismo inoculado. Essa competição pode influenciar negativamente na degradação por isso é necessário avaliar o inoculo para introduzir métodos que otimizem o processo.

4. CONCLUSÃO

O presente estudo destaca a possibilidade de utilizar a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e o fungo *Pleurotus ostreatos*, pois esses microrganismos se mostraram promissores na biodegradação do OD. Entretanto, para uma aplicação real ensaios com mais tempo de exposição, processos de otimização e estudos são necessários.

5. REFERENCIAS

ABTAHI, H.; PARHAMFAR, M.; SAEEDI, R.; VILLASENOR, J.; SARTAJ, M.; KUMAR, V.; COULON, F.; PARHAMFAR, M.; DIDEHDAR, M.; SEIFI, H.; KOOLIVAND, A.; Effect of competition between petroleum-degrading bacteria and indigenous compost microorganisms on the efficiency of petroleum sludge bioremediation: Field application of mineral-based culture in the composting process. Journal of Environmental Management 258 (2020) 110013.

CETESB - COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. Disponível em http://www.cetesb.sp.gov.br/areas-contaminadas. Acesso em 02 de junho de 2018.

EATON, A.D.; CLESCERI L.S.; GREENBERG A.E.; Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association 19th ed. (1995).

FERNANDES, J.P.; DUARTE, P.; ALMEIDA, M. R.; CARVALHO, M. F.; MURCHA, A. P. Potential of bacterial consortia obtained from different environments for bioremediation of paroxetine and bezafibrate. Journal of Environmental Chemical Engineering 8 (2020) 103881.

GIOVANELLA, P.; VIEIRA, G. A.; OTERO, I. V. R.; PELLIZZER, E. P.; FONTES, B. J.; SETTE, L. D. Metal and organic pollutants bioremediation by extremophile microorganisms. Journal of Hazardous Materials 382 (2020) 121024.

ŁAWNICZAK, Ł. WOŹNIAK-KARCZEWSKA M.; LOIBNER AP.; HEIPIEPER HJ.; CHRZANOWSKI Ł. Microbial Degradation of Hydrocarbons-Basic Principles for Bioremediation. Molecules 25 (2020) 856.

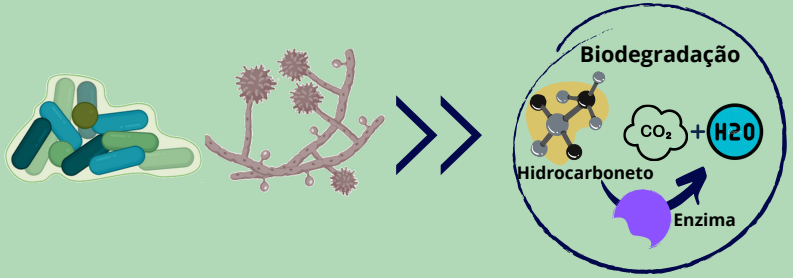
MARIANO, A.P. Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel. Tese de doutorado – UNESP. Rio Claro, p. 66. 2006.

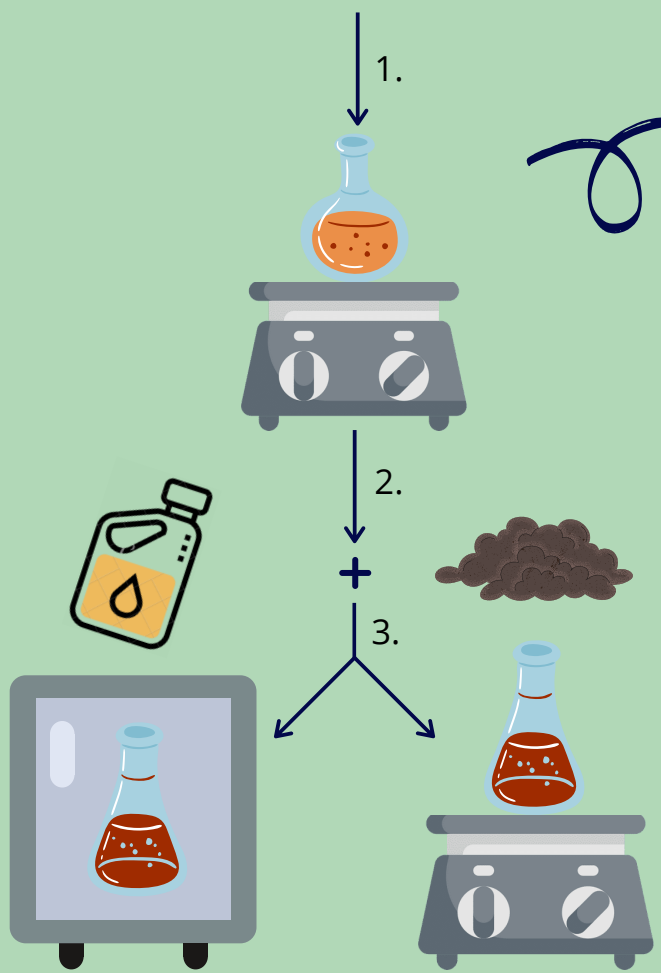
PIETRO-SOUZA, W.; PEREIRA, F.C.; MELLO, I.S.; STACHACK, F.F.F.; TEREZO, A.J.; WHITE, J. F.; LI, H.; SOARES, M. A. Mercury resistance and bioremediation mediated by endophytic fungi. Chemosphere 240 (2020) 124874.

PIRÔLLO, MSP. Estudo de produção de biossurfactantes que utilizam hidrocarbonetos. Dissertação de mestrado – UNESP. Rio Claro, p. 21. 2006.

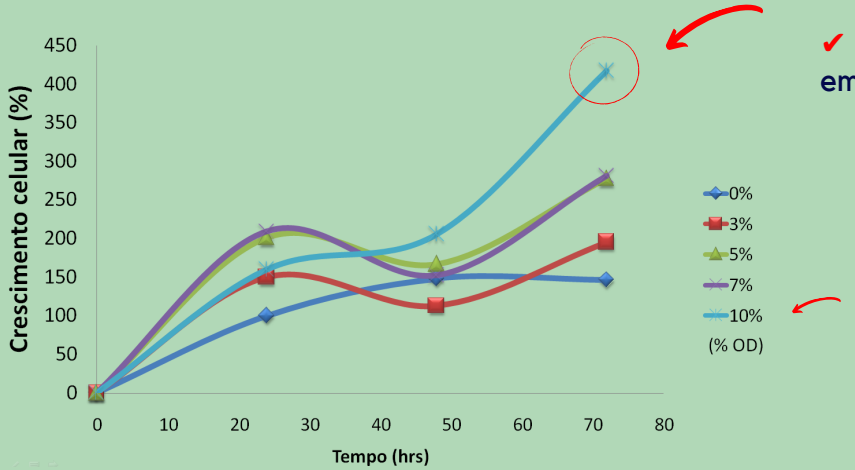
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO MICROBIANA EM ÓLEO DIESEL SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO.

Vithória C. T. Santos, Guilherme R. Freitas, Cristiane A. Ottoni.

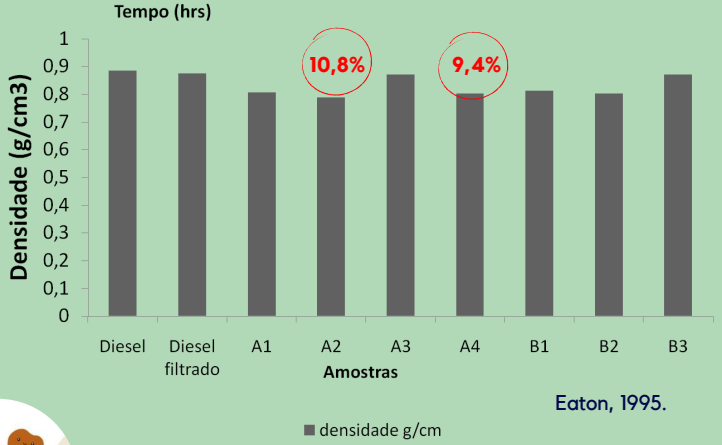




Mariano, 2006.

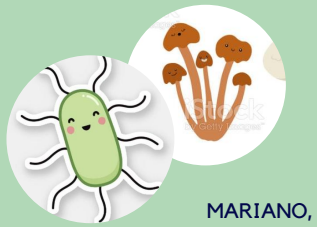


✔ Melhor desempenho em 72 hrs.



Eaton, 1995.

✔ Maiores taxas de biodegradação.



→ O estudo destaca a possibilidade de utilizar os microbianos para a biorremediação. Entretanto, novos ensaios com maior tempo de exposição e otimização do processo são necessários.

REFERENCIAS

MARIANO, A.P. Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel. Tese de doutorado – UNESP. Rio Claro, p. 66. 2006.

EATON, A.D.; CLESCERI L.S.; GREENBERG A.E.; Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association 19th ed. (1995[BA1]).

BIOTECNOLOGIA APLICADA NA REPRODUÇÃO DE BOVINOS: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

EDUARDO FLORENTINO SILVA[1];
CLAUDIMARY BISPO DOS SANTOS[2]

[1] Universidade Estadual de Alagoas-UNEAL 1 – eduardoflorentino123@gmail.com
[2]Universidade Estadual de Alagoas-UNEAL 2 – claudimarybs@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Morris, Diskin e Sreenan (2001) descreveram a biotecnologia como uma "nova" ciência ou alta tecnologia condutora das indústrias farmacêuticas, médica e agroalimentar e é aplicada para a produção ou modificação de produtos. Para Wetherington (2010) a moderna biotecnologia está primariamente associada à biologia molecular, clonagem e a engenharia genética.

Na área agroalimentar, a biotecnologia avança com pesquisas na área agrícola com a produção de alimentos modificados geneticamente e também na reprodução animal, a partir de tecnologias, como o uso de inseminação artificial, considerada a 1ª geração no desenvolvimento de tecnologias de reprodução assistida para humanos e animais (BERTOLINI; BERTOLINI 2009).

Segundo Cowan (2010) a inseminação artificial foi um avanço tecnológico no tradicional método seletivo de reprodução e importante ferramenta para o desenvolvimento da indústria de produção animal.

Atualmente tornou-se indispensável o uso de biotécnicas em reprodução animal para manter uma qualidade reprodutiva eficiente do rebanho. Dentro do cenário sul americano e mundial, o Brasil se destacou como o quinto maior produtor mundial de embriões bovinos coletados *in vivo* em 2013, sendo 66% em bovinos de corte e 34% em bovinos de leite (IETS, 2014).

Dessa forma, a utilização de biotécnicas vem se tornando cada vez mais aplicável, aprimorando os ganhos no setor em um curto espaço de tempo. Diante disso, este trabalho tem como objetivo descrever a importância do uso da biotecnologia da reprodução, evidenciando a efetividade das técnicas, suas aplicabilidades e limitações, bem como sua viabilidade na pecuária bovina no Brasil.

2. METODOLOGIA

Trata-se de um estudo descritivo com base em uma revisão bibliográfica, através do google acadêmico, cujos descritores foram: biotecnologia, reprodução animal e bovinos. Sendo incluídos os trabalhos desenvolvidos, no Brasil, a partir do ano de 2010 a 2019, os quais apresentavam conceitos básicos e características da biotecnologia da reprodução, bem como as metodologias aplicadas inseridas, no contexto da reprodução bovina.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os estudos selecionados que enfatiza sobre a importância da biotecnologia da reprodução, Marques (2011) se refere a biotecnologia como tecnologias modernas aplicadas a um modelo biológico e que o seu uso tem sido expandido dentro da cadeia de reprodução, com intuito de aumentar a produção e qualidade dos produtos de origem animal.

Segundo Gusmão; Silva; Medeiros (2017), a interferência do homem na alteração da composição gênica dos seres vivos não é recente e muito antes do aparecimento da genética, os agricultores e criadores de animais já procuravam melhorar a qualidade de suas plantas e animais domésticos.

A aplicação da biotecnologia, na agricultura e na pecuária, surge com a exigência de aumento da produção de alimentos com menor custo, diminuindo o impacto causado por doenças e redução da necessidade de trabalho. Na pecuária, a intervenção da biotecnologia está presente no controle da reprodução e na aceleração da seleção genética, através das técnicas de inseminação artificial, transferência de embrião, produção in vitro, clonagem, marcadores moleculares, mapeamento do genoma e transgenia (GUSMÃO; SILVA; MEDEIROS, 2017).

A inseminação artificial (IA) é a biotecnologia reprodutiva mais empregada em todo o mundo e sua aplicação traz grandes vantagens para os rebanhos, quando comparada com a utilização da monta natural (LIMA et al., 2010; LAMB e MERCADANTE, 2016; BARUSELLI et al., 2018). Essa técnica permite a utilização do sêmen de touros geneticamente superiores, acelerando o ganho genético e resultando em bezerros mais produtivos que geram maior retorno econômico ao produtor de carne e de leite. Além disso, evita a transmissão de doenças venéreas e permite o melhor controle do rebanho, aumentando a uniformidade dos bezerros produzidos (RODGERS et al., 2015).

A técnica de IA em bovinos se desenvolveu a partir de meados da década de 1970, enquanto que os estudos de transferência de embriões foram iniciandos no final da década de 1970. Mato Grosso, atualmente é o estado brasileiro mais relevante na comercialização (compra) de sêmem de bovino de corte seguido por Mato Grosso do Sul, Goiás, Pará e Rio Grande do Sul, enquanto que Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná, e Santa Catarina e Goiás são os estados que mais consomem sêmem de bovino leiteiro (ASBIA, 2014).

Com o objetivo de facilitar a utilização da IA nas propriedades rurais foi desenvolvida a tecnologia de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) que promove o controle do crescimento folicular e da ovulação e permite a aplicação da IA em dias predeterminados, sem a necessidade de detecção de estro e com elevadas taxas de prenhez, aumentando a eficiência reprodutiva e produtiva das fazendas de corte e de leite, quando comparado com a monta natural (BARUSELLI et al., 2018).

Atualmente, 86% das inseminações no Brasil estão sendo realizadas por IATF. Com a colaboração dessa tecnologia, verificou-se que o percentual de fêmeas em idade reprodutiva inseminadas artificialmente passou de 5,8% em 2002 para 13,1% em 2018 (BARUSELLI et al., 2019).

Apesar dos avanços com o uso da IATF, 87% das fêmeas em idade reprodutiva ainda são submetidas a monta natural e estima-se que apenas 8% dos touros utilizados para monta natural apresentam avaliação genética para produtividade. Sendo assim, o setor pecuário brasileiro utiliza pouco a tecnologia para o melhoramento genético e produtivo do rebanho (BARUSELLI et al., 2019).

Segundo Viana (2018), o levantamento anual da International Embryo Technology Society (IETS), em 2017, mostra que o número de embriões bovinos produzidos e transferidos foi maior em embriões produzidos *in vitro* (PIV) que em embriões *in vivo,* representando um aumento de 48,9% em embriões PIV e uma redução de 21,7% em embriões *in vivo* em relação a 2016.

Além disso, apesar da América do Sul ser a líder no número de embriões transferidos, pela primeira vez desde 1999, a América do Norte produziu mais embriões PIV que a América do Sul, sendo os EUA responsável por produzir aproximadamente 45% (454.550) e o Brasil 34% (345.528) dos embriões bovinos PIV no mundo (Viana, 2018).

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que, atualmente, a utilização de biotecnologias aplicada na reprodução animal, conta com tecnologias bem estabelecidas para aumentar a utilização da inseminação artificial nas fazendas, com avaliação positiva do retorno econômico, gerando valor para o produtor e para a cadeia de produção de carne e de leite. Os estudos revisados demonstram que as características da pecuária em países como o Brasil induzem à necessidade de desenvolver e adaptar tecnologias que proporcionem aumentos significativos na produtividade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL. Index ASBIA mercado 2014. Uberaba: ASBIA, 2014. Disponível em: < http://www.asbia.org.br/novo/upload/mercado/index2014.pdf. Acesso em julho 2020.

BARUSELLI, P.S.; CATUSSI, B.L.C.; ABREU, L. A. et al. Evolução e perspectivas da inseminação artificial em bovinos. **Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal** (CBRA-2019); Gramado, RS, 15 a 17 de maio de 2019.

BARUSELLI, P.S.; FERREIRA, R.M.; SÁ FILHO, M.F.; BÓ, G.A. Review: Using artificial insemination v. natural service in beef herds. **Animal,** v.12, p.45-52, 2018.

BERTOLINI, M.; BERTOLINI, L.R. Advances in reproductive technologies in cattle from artificial insemination to cloning. **Rev. Med. Vet. Zoot**. v.56, p. 184-94, 2009.

COWAN, T. 2010. Biotechnology in Animal Agriculture: Status and Current Issues. Congressional Research Service, Analyst in Natural Resources and Rural Development.

Acessado em 10 de junho de 2020. Online. Disponível em: http://www.cnie.org/NLE/CRSreports/10Oct/RL33334.pdf.

GUSMÃO, A.O.M.; SILVA, A.R.; MEDEIROS, M.O. A biotecnologia e os avanços da sociedade. **Biodiversidade** - v.16, n1, p.135 a 154, 2017.

IETS. 2013 Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 32 (4) p. 14-26, 2014.

LAMB, G.C.; MERCADANTE, V.R.G. Synchronization and artificial insemination strategies in beef cattle. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v.32, p.335-334, 2016.

LIMA, F.S.; VRIES, A.D.E.; RISCO, C.A.; SANTOS, J.E.P.; THATCHER, W.W. Economic comparison of natural service and timed artificial insemination breeding programs in dairy cattle. **J Dairy Sci,** v.93, p.4404-4413, 2010.

MARQUES, M. Biotécnicas aplicadas à produção de suínos: Atualização e perspectivas de uso. IN: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE SUINOCULTURA. **Anais do IV Simpósio Brasil Sul de Suinocultura e do III Brasil Sul Pig Fair**, 2011.

MORRIS, DG; DISKIN, M.G.; SREENAM, J.M. Biotechnology in cattle reproduction. **Beef Production,** series n° 39, 2001.

RODGERS, J.C.; BIRD, S.L.; LARSON, J.E.; DILORENZO, N.; DAHLEN, C.R.; DICOSTANZO, A.; LAM, G.C. An economic evaluation of estrous synchronization and timed artificial insemination in suckled beef cows. **J Anim Sci,** v.10, p.1297-1308, 2015.

VIANA, J. 2017 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo Technology Newsletter**, Champaign, v. 36, n. 4, p. 8-25, 2018.

WETHERINGTON, J. Introduction to Biotechnology: A Georgia Teachers Resource Manual. 2010, 87p.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

BIOTECNOLOGIA APLICADA NA REPRODUÇÃO DE BOVINOS: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

EDUARDO FLORENTINO SILVA[1];
CLAUDIMARY BISPO DOS SANTOS[2]



Artigos selecionados: desenvolvidos, no Brasil, a partir do ano de 2010 a 2019

Artigos contextualizam: conceitos básicos e características da biotecnologia da reprodução; e as metodologias aplicadas na reprodução bovina.



Inseminação artificial: biotecnologia reprodutiva mais empregada (LIMA et al., 2010)



Inseminação artificial em tempo fixo (IATF): aumenta a eficiência reprodutiva dos bovinos de corte e de leite (BARUSELLI et al., 2018).

Estudos revisados demonstram a necessidade de desenvolver e adaptar tecnologias que proporcionem aumentos significativos na produtividade.

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO BUTAFOSFAN SOBRE O CONSUMO, PRODUÇÃO DE LEITE E PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS DE VACAS LEITEIRAS

JORDANI BORGES CARDOSO[1]; MILENE LOPES DOS SANTOS[2]; KAUANI BORGES CARDOSO[2]; ANTÔNIO AMARAL BARBOSA[2]; CAMILA PIZONI[2]; MARCIO NUNES CORRÊA[3]

[1]Universidade Federal de Pelotas – jordanicardoso.12@gmail.com
[2]Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária- nupeec@gmail.com
[3]Universidade Federal de Pelotas – marcio.nunescorrea@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O periparto apresenta muitos desafios à vaca leiteira, pois é o período em que ocorre a transição da gestação para a lactação, alterando comportamento, fisiologia e aspectos nutricionais, que promovem um balanço energético negativo (BEN) (NETO et al, 2011). O BEN, ocorre principalmente em vacas de alta produção, predispondo aos principais transtornos metabólicos do seu ciclo produtivo (LEBLANC et al, 2006). Esses distúrbios alteram o comportamento natural desses animais diminuindo tempo de atividade e ruminação e aumentando tempo em ócio (ZANIIN et al, 2016). Sendo assim fica evidente que a utilização de métodos de avaliação destes parâmetros podem auxiliar na avaliação de perfis comportamentais desses animais aumentando as chances do diagnóstico precoce de enfermidades.

Além disso, o consumo de matéria seca no início da lactação ainda não se reestabeleceu, sendo observado déficit de 10 a 30% na ingestão, e quando associado a um aumento na produção de leite, característico dessa fase inicial de lactação, provoca maior demanda de glicose pelos tecidos (GRUMMER et al, 2007). Como a dieta não está atendendo essa demanda, devido ao consumo não estar em seu máximo potencial, é necessário a adoção de alternativas para melhorar o status energético do animal, como o uso do Butafosfan, um produto derivado do ácido fosfórico, responsável pelo fornecimento de íons fosfato (Pi) (PEREIRA et al, 2013).

O fósforo é um macromineral essencial que participa do metabolismo energético e auxilia na redução das reações metabólicas de estresse, diminuindo os níveis de cortisol e elevando a insulinemia, favorecendo a entrada de glicose na célula e atenuando os efeitos do período de transição nas vacas leiteiras (FÜRLL et al, 2010). Com base nisso, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da administração de Butafosfan na produção de leite, consumo alimentar e comportamento dos animais periparturientes.

2. METODOLOGIA

O experimento foi realizado em uma propriedade leiteira no município de Rio Grande-RS (32º 16 'S, 52 ° 32'W), de maio a julho de 2019. Todos os procedimentos com animais foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal de Pelotas, sob código

0102025-2017. Foram utilizadas 20 vacas holandesas multíparas, recém-paridas, as quais eram mantidas em sistema de confinamento no modelo *compost barn*. Essas eram ordenhadas duas vezes ao dia, alimentadas três vezes ao dia, com ração totalmente misturada (TMR), calculada para atender as exigências nutricionais de acordo com o NRC (2001) com água *ad libitum*.

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: grupo controle, recebendo uma dose intramuscular de solução salina (25mL/vaca por dia) e grupo Butafosfan, recebendo uma dose intramuscular de Butafosfan (5 mL a cada 100 kg de peso vivo/vaca/dia). As aplicações foram realizadas nos dias 0, 3 e 7 dias após o parto.

Foi avaliado o comportamento animal por meio de coleiras de rastreamento individuais (ChipInside®, Brasil) que indicam diariamente o tempo de atividade, ruminação e ociosidade dos animais (min / dia). Já o consumo individual (kg/MV) foi avaliado através de alimentadores automáticos (Intergado®, Brasil) durante os primeiros 21 dias de lactação. Foram coletadas amostras de TMR diariamente de cada alimentador imediatamente após a alimentação e encaminhadas ao Laboratório de Nutrição Animal do Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (Nupeec-UFPel) para análises bromatológicas onde foi determinadomatéria seca (MS), matéria orgânica (MO), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), nutrientes digestíveis totais (NDT) e amido. Primeiramente, as amostras de TMR foram submetidas a um pré-secagem, em estufa de ar forçado a 55°C por 72 horas para cálculo de IMS. As informações sobre a composição da dieta e resultados das análises bromatológicas estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Composição química da dieta fornecida aos animais no período experimental

Matéria Seca (%)	51,20
Matéria Orgânica (%)	94,03
Proteína Bruta (% de MS)	14,85
Fibra em detergente neutro (% de MS)	37,40
Fibra em detergente ácida (% de MS)	21,40
Nutrientes digestíveis totais (% de MS)	72,42
Amido (% de MS)	18,84

Composição da dieta (% de MS): Pré-secado de Azevém (3,96); Silagem de grão úmido (3,96); Milho moído (1,96); Farelo de soja (6,41); Farelo de arroz (3,76); Resíduo de Arroz (1,98); Tamponante (3,96) e Adsorvente de micotoxinas (0,019).

Para a análise estatística dos dados obtidos foi utilizado Statistcal Analysis System (2009), onde todas as variáveis foram submetidas à análise de normalidade por meio do Teste de Shapiro-Wilk (P>0,90) e posteriormente submetidos a análise de Tukey-Kramer, por meio do teste ANOVA PROC MIXED, sendo considerado diferença estatística quando o $p<0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 2: Média de consumo, comportamento e produção de leite de vacas holandesas suplementadas ou não com Butafosfan durante o pós-parto recente.

Variável	Grupos		Valor de p		
	Butafosfan	Controle	Grupo	Dia	G*D
Consumo (kg/MS/dia)	17,44±0,72	21,05±0,52	<0,0001	<0,0001	0,7375
Produção de leite (L/dia)	29,81±0,916	31,75±0,907	0,13	0,25	0,87
Ócio (mim/dia)	655,72±10,05	602,88±9,28	0,0001	0,8115	0,2239
Atividade (mim/dia)	150,87±11,13	200,66 ±10,28	0,0012	0,6844	0,9991
Ruminação (mim/dia)	633,08±11,36	636,46±10,49	0,8276	0,2329	0,9209

O grupo Butafosfan diminuiu o consumo (Tabela 2), acredita-se que seja uma resposta do metabolismo energético, pois é encontrado na literatura aumento dos níveis de glicose em animais suplementados com Butafosfan (ANTUNES et al, 2019; RINCÓN et al, 2016), devido ao acréscimo do hormônio glucagon, responsável pela produção e liberação de glicose no fígado, através da glicogenólise, sendo uma fonte de substrato para a formação de glicose-1 fosfato, e formação de ATP (NUBER et al,2016; ANTUNES et al, 2019). Reafirmamos essa hipótese ao comparar a produção e observar que não diferiu entre os grupos (tabela 2), indicando que as vacas do grupo Butafosfan foram mais eficientes para produzir leite.

Como efeito da diminuição do consumo, foi observado que os animais do grupo Butafosfan também apresentaram redução na atividade (Tabela 2), isso ocorreu devido existir uma correlação positiva entre esses parâmetros (consumo e atividade), OLIVEIRA et al. (2011) apontam que o ato de alimentação, é a principal atividade da vaca. Já ao avaliarmos o ócio, observamos que houve aumento, devido esse ser um parâmetro antagônico aos citados anteriormente, ou seja, quando a vaca diminuiu o consumo e com isso o tempo para se alimentar, aumentou o período de repouso (VIEIRA et al, 2019). Quanto ao tempo de ruminação, não houve diferença entre os grupos ($p>0,05$), apesar do grupo Butafosfan ter apresentado uma diminuição do consumo, estes resultados estão dentro do padrões para animais saudáveis, de acordo com ZANIIN et al. (2016) que relatam que vacas em lactação destinam em média de 420 a 600 min do dia para ruminar.

4. CONCLUSÕES

Concluímos que a administração de Butafosfan em vacas leiteiras diminuiu a ingestão de alimento, a atividade e aumentou o tempo em ócio sem alterar o tempo de ruminação e a produção de leite.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, M. M., LONDERO, U. S., PIZONI, C., FEIJÓ, J. de O., PRIETSCH, R. da F., BARBOSA, S.C., PRIMEL, E. G., HERTZOG, G. I., PEREIRA, R.A. RINCÓN, J. A.A., DEL PINO, F. A. B., RABASSA, V. R., CORRÊA, M. N. Hemogasometry, metabolic profile and acutephase proteins in primiparous Holstein cows supplemented with butafosfana associated or not of cyanocobalamin. **Italian Journal of Animal Science**, London, v.18, n.1, p.957–962, 2019.

FÜRLL, M., DENIZ, A., WESTPHAL, B., ILLING, C., CONSTABLE, P. D. Effect of multiple intravenous injections of butaphosphan and cyanocobalamin on the metabolism of periparturient dairy cows. **Journal of dairy science**, Missouri, v.*93, n*.9, p.4155-4164, 2010.

GRUMMER, R.R. Strategies to improve fertility of high yielding dairy farms: Management of the dry period. **Theriogenology,** Montgomery, v.68, p.281-288, 2007.

LEBLANC, S., LISSEMORE, K.; KELTON, D.; DUFFIELD, T.; and LESLIE, K. Major advances in disease prevention in dairy cattle. **Journal of dairy science**, Missouri, v.89, p.267-1279, 2006.

NETO, A. C.; DA SILVA, J. F. C.; DEMINICIS, B. B.; FERNANDES, A. M.; JARDIM, J. G.; AMORIM, M. M.; GUIMARÃES FILHO, C. C. Problemas metabólicos provenientes do manejo nutricional incorreto em vacas leiteiras de alta produção recém paridas. **Revista Electrónica de Veterinária**, São Paulo, v. 12, n. 11, p.1-25, 2011.

NUBER, U., DORLAND, H. A., BRUCKMAIER, R.M. Effects of butafosfan with or without cyanocobalamin on the metabolism of early lactating cows with subclinical ketosis. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, United Kingdom, v. 100, n. 1, p. 146-155, 2016.

OLIVEIRA B. C.; CAETANO, G. A. O.; CAETANO JÚNIOR, M. B.; MARTINS, T.R.; OLIVEIRA, C. B. Mecanismos reguladores de consumo em bovinos de corte. **Revista Eletrônica Nutritime**, Viçosa, v. 14, n. 4, p. 6066-6075, 2017.

PEREIRA, R. A.; SILVEIRA, P. A. S.; MONTAGNER, P.; SCHNEIDER, A.; SCHMITT, E.; RABASSA, V. R.; CORRÊA, M. N. Effect of butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum metabolism and milk production in dairy cows. *Animal: an International Journal of Animal Bioscience*, Cambridge*, v.7,* n.7, p.1143-1147, 2013.

RINCÓN, J. A.; WEILLER, M. A.; BRACHAK, M.; COPES, V. M.; BARROS, C. C.; CORRÊA, M. N. O fósforo orgânico favorece a resistência à insulina periférica. In: **XVIII Encontro de Pós-graduação UFPEL,** Pelotas, 2015.

VIEIRA, L. V.; PIZONI, C.; SOUZA, V. I.; CORRÊA, M. N. Monitoramento do comportamento ingestivo de vacas leiteiras da raça holandês no período pós-parto, a partir de dados de consumo e ruminação. In: **XXI Encontro de Pós-graduação UFPEL,** Pelotas**,** 2019.

ZANIN, E.; FREGONESI, J. A.; MANGILLI, L. G. Comportamento e bem-estar de vacas leiteiras submetidas à secagem: Revisão. **Revista eletrônica Pubvet**, Maringá, v.10, n.5, p. 370-380, 2016.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA

Saúde única

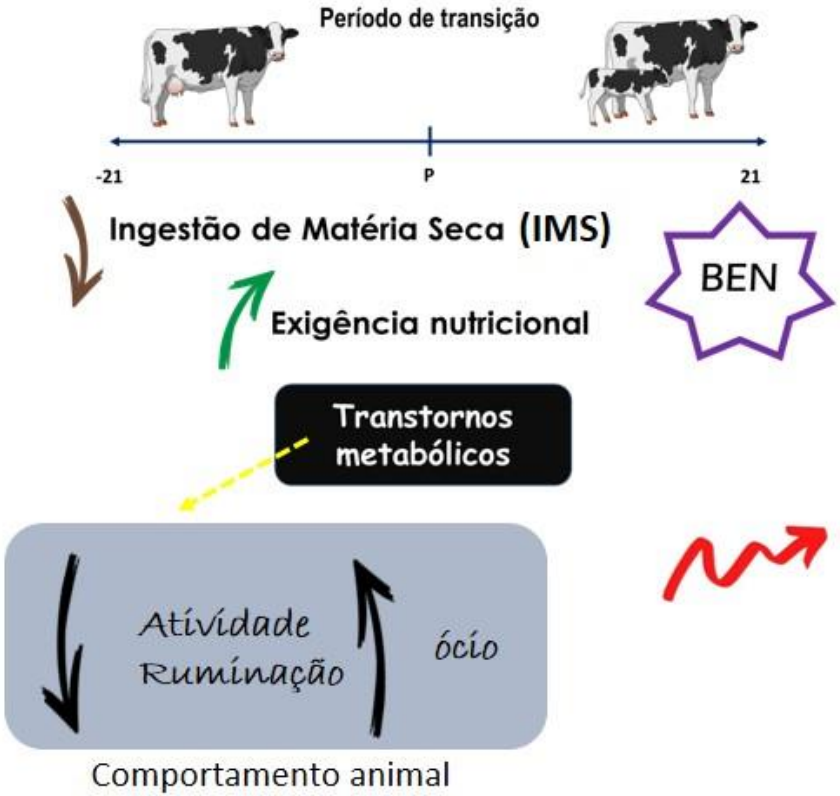
IV MOSTRA ACADÊMICA

Graduação

PPGB

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO BUTAFOSFAN SOBRE O CONSUMO, PRODUÇÃO DE LEITE E PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS DE VACAS LEITEIRAS

JORDANI BORGES CARDOSO[1]; MILENE LOPES DOS SANTOS[2]; KAUANI BORGES CARDOSO[2]; ANTÔNIO AMARAL BARBOSA[2]; CAMILA PIZONI[2]; MARCIO NUNES CORRÊA[3]



Melhora o status energético da vaca leiteira

15

P

PHOSPHORUS

Objetivo: Avaliar o efeito da administração de Butafosfan na produção de leite, consumo alimentar e comportamento dos animais periparturientes.

Conclusão: A administração de Butafosfan em vacas leiteiras diminuiu a ingestão de alimento, e a atividade, aumentou o tempo em ócio, mas não alterou o tempo de ruminação e produção de leite.

UTILIZAÇÃO DE BUTAFOSFAN NO COMPORTAMENTO ALIMENTAR E PRODUÇÃO DE VACAS LEITEIRAS NO PÓS-PARTO RECENTE

KAUANI BORGES CARDOSO[1]; CAMILA PIZONI[2]; ANTÔNIO AMARAL BARBOSA[2]; JORDANI BORGES CARDOSO[2]; EDUARDO SCHMITT[2]; MARCIO NUNES CORRÊA[3].

[1]Universidade Federal de Pelotas – kauaniborgescardoso@gmail.com
[2] NUPEEC – nupeec@gmail.com
[3]Universidade Federal de Pelotas– marcio.nunescorrea@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O período de transição de vacas leiteiras é marcado por intensas modificações a nível nutricional, imunológico e metabólico. Uma das alterações mais representativas é a redução da ingestão de matéria seca (IMS) podendo causar uma diminuição de até 30% nesse período que, quando associada a maior demanda energética, provoca um estado fisiológico denominado balanço energético negativo (BEN) (GRUMMER, 2007).

Essas alterações tornam os animais mais susceptíveis a ocorrência de enfermidades, sendo que 75% destas ocorrem no primeiro mês após o parto (LEBLANC et al., 2006). Neste contexto, a diminuição do consumo alimentar no pós-parto recente é um evento fisiológico que vem a ser um dos grandes desafios no que tange a diminuição da severidade do BEN nesse período.

Sendo assim, algumas alternativas vêm sendo estudadas para amenizar os efeitos deletérios que o período de transição ocasiona à vida produtiva da vaca leiteira. Uma dessas possibilidades é a utilização do butafosfan, conhecido quimicamente como 1-butilamino-1-metil ácido etilfosfórico, a qual é uma molécula capaz de fornecer íons fosfato, essenciais para muitas reações celulares (GONZÁLES; SILVA, 2006), principalmente no que tange a fosforilação e fosfatação de intermediários do metabolismo da glicose, assim como ativação e inibição da glicólise e gliconeogênese (RAINA et al., 2012). Além disso ainda atua modulando o perfil energético dos animais e interferindo na ingestão de matéria seca, parâmetro altamente relevante para o período de transição (FARESE et al., 2012). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da aplicação de butafosfan no comportamento alimentar e produção de vacas leiteiras no pós-parto recente.

2. METODOLOGIA

O experimento foi realizado em uma propriedade comercial no município de Rio Grande, no Rio Grande do Sul. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas, sob código 0102025-2017. Foram utilizadas 20 vacas da raça Holandês multíparas, mantidas em sistema *compost barn,* ordenhadas duas vezes ao dia. Os animais foram divididos aleatoriamente em grupo Controle, que recebeu uma dose

intramuscular de solução salina (25mL/vaca por dia) e grupo Butafosfan, que recebeu uma dose intramuscular de butafosfan (5 mL/100kg). As aplicações foram realizadas em 0, 3 e 7 dias após o parto. A dieta foi calculada para atender as exigências nutricionais de acordo com o NRC (2001), a alimentação era fornecida três vezes ao dia em forma de ração mista total (TMR) (tabela 1) e água *ad libitum*.

Tabela 1. Ingredientes e composição química da dieta utilizada no período experimental (Base MS).

Item	
Ánalise Bromatológica (composição química)	
Matéria Seca (%)	51,20
Matéria Orgânica (%)	94,03
Proteína Bruta (% de MS)	14,85
Fibra em Detergente Neutro (% de MS)	37,40
Fibra em Detergente Ácido (% de MS)	21,40
Nutrientes Digestíveis totais (% de MS)	72,42
Amido (% de MS)	18,84

Composição da TMR (% de MS) - Pré-secado de Azevém (3,96%), Silagem de grão úmido (3,96%), Milho moído (1,98%), Silagem de milho (53,56%), Farelo de Soja (6,41%), Farelo de Arroz (3,76%), Resíduo de Arroz (1,98%), Casca de soja (5,15%, Tamponante (3,96%), adsorvente de micotoxinas (0,01%).

O consumo e o comportamento alimentar foram avaliados individualmente através de alimentadores automáticos (Intergado®, Brasil), monitorando a IMS (kg), Tempo de consumo (min/dia), Frequência das refeições (refeições/dia), Tamanho das refeições (kg/refeição) e Duração da refeição (min) até o 21° dia pós-parto. As amostras de TMR foram coletadas diariamente de cada alimentador imediatamente após a alimentação. Já a materia pré-seca foi medida por amostragem da dieta experimental, após, foi seco em estufa de ar forçado a 55°C ao longo de 72 horas para cálculo de IMS. Para a análise estátistica dos dados obtidos foi utilizado Statistcal Analysis System (2009), todas as variáveis foram submetidas à análise de normalidade por meio do Teste de Shapiro-Wilk (P>0,90), após submetidas a análise de Tukey-Kramer, por meio do teste ANOVA PROC MIXED, sendo que diferença estatistica foi considerada quando p<0,05.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros de ingestão e comportamento alimentar diferiram entre os grupos, sendo o grupo Butafosfan o que apresentou menor IMS, tempo de consumo, frequência, tamanho e duração das refeições (p<0,05) (Tabela 1) enquanto a produção de leite não diferiu entre os grupos.

Tabela 2. Consumo, comportamento alimentar e produção de leite dos grupos Butafosfan e Controle no pós-parto recente.

Parâmetros	Butafosfan	Controle	Valor de P

			Grupo	Dia	G*D[7]
IMS[1]	17,44±0,72	21,05±0,52	<0,01	0,01	0,73
Tempo de consumo[2]	107,57±4,76	136,22±3,43	<0,01	<0,01	0,56
Frequência das refeições[3]	17,14±1,27	21,15±0,90	0,01	0,95	0,99
Tamanho das refeições[4]	1,10±0,15	1,50±0,10	0,03	0,99	0,99
Duração da refeição[5]	6,87±0,84	9,27±0,59	0,02	0,98	0,99
Produção de leite[6]	29,81±0,916	31,75±0,907	0,13	0,25	0,87

[1]Ingestão de Matéria Seca, Kg; [2]Min/dia; [3]Refeições/dia; [4]Kg/refeição; [5]Min; [6]Litros /dia; [7]Grupo*Dia

A menor IMS encontrada no grupo Butafosfan pode ser o reflexo de um possível aumento na concentração de glucagon, como já relatado por (NUBER et al., 2016). A via de atuação do glucagon no centro da saciedade não está bem elucidada, mas acredita-se que esteja relacionada com a glicogenólise, responsável pelo aumento da glicose a nível hepático (ANTUNES et al. 2019; NASCIMENTO et al., 2009). Essa diminuição no consumo, no entanto não refletiu na produção de leite, uma vez que, os grupos não diferiram entre si ($p>0,05$), o que nos mostra que a aplicação de Butafosfan gera um incremento de energia para a produção de leite, tornando os animais mais eficientes dentro do sistema de produção. No entanto ROLLING et al. (2010) PEREIRA et al., (2013) discordam dos resultados encontrados, uma vez que encontraram maior produção de leite e aumento do apetite em animais tratados com Butafosfan e Cianocobalamina. Sendo assim acreditamos que a menor IMS seja um reflexo do aumento da glicose a nível hepático, dado que os ruminantes tem a capacidade de regular o consumo através da glicemia por receptores no fígado (OLIVEIRA et al., 2017; SOUZA; MOREIRA, 2017).

Quanto aos parâmetros comportamentais, já era esperado que os animais tratados com Butafosfan apresentassem menor número de visitas ao cocho, menor tempo de consumo, refeições mais curtas e em menor tempo, uma vez que obtiveram uma menor IMS. Corroborando com GRANT; ALBRIGHTT (1995) que descrevem a IMS diária como um reflexo do número, duração e tamanho médio das refeições e HUZZEY et al. (2005) que afirmam que os parâmetros comportamentais se modulam com a ingestão de alimento. No entanto GRANT; ALBRIGHTT (1995), ainda correlacionam a produção de leite com a IMS, tamanho e a duração das refeições, resultado esse que vai de encontro aos demonstrados no presente estudo, visto que a produção foi semelhante entre grupos.

4. CONCLUSÕES

Com base no apresentado observou-se que a aplicação de Butafosfan diminuiu a IMS assim como, todos parâmetros de comportamento alimentar de vacas leiteiras no pós-parto recente sem alterar a produção de leite.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, M.M.; LONDERO, U.S.; PIZONI, C.; FEIJÓ, J.O.; PRIETSCH, R.F.; BARBOSA, S.C.; PRIMEL, E.G.; HERTZOG, G.I.; PEREIRA, R.A.; RINCÓN, J.A.A.; DEL PINO, F.A.B.; RABASSA, V. R.; CORRÊA, M.N. Hemogasometry, metabolic profile and acutephase proteins in primiparous Holstein cows supplemented with butafosfana associated or not of cyanocobalamin. **Italian Journal of Animal Science**, London, v.18, n.1, p. 957–962, 2019.

FARESE, R.V.; ZECHNER, R.; NEWGARD, C.B.; WALTHER, T.C. The problem of establishing relationships between hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. **Cell metabolism**, United States, v.15, n.5, p.570-573, 2012.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S. C.; **Introdução à Bioquímica Veterinária;** Brasil**:** Editora da UFRGS; 2ª Edição; p.55, 229-230, 2006.

GRANT, R.J., ALBRIGHTT, J. L. Feeding Behavior and Management Factors During the Transition Period in Dairy Cattle. **Journal of Animal Science**, United States, v.73 p.2791-2803,1995.

GRUMMER, R.R. Strategies to improve fertility of high yielding dairy farms: Management of the dry period. **Theriogenology**, Montgomery, v.68, p.281-288, 2007.

HUZZEY, J. M., VON KEYSERLINGK, M. A. G., Weary. D. M. Changes in Feeding, Drinking, and Standing Behavior of Dairy Cows During the Transition Period. **Journal of Animal Science**, United States, v.7, n. 88, p.2454–246. 2005.

LEBLANC, S.; LISSEMORE, K.; KELTON, D.; DUFFIELD, T.; LESLIE, K. Major advances in disease prevention in dairy cattle. **Journal of dairy science**, United States, v.89, p.267-1279, 2006.

NASCIMENTO, P.M.L.; FARJALLA, B.; NASCIMENTO, J. L.do. Consumo voluntário de bovinos-Bovines voluntary intake. **RedVet**, Espanã, v.10, n.10, 2009.

NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL). 2001. Nutrient requeriments of dairy cattle. 7th rev. Ed. Washington, D. C. **National Academy Press**. 381 p.

NUBER, U.; DORLAND, H.A.; BRUCKMAIER, R.M. Effects of butafosfan with or without cyanocobalamin on the metabolism of early lactating cows with subclinical ketosis. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, United Kingdom, v. 100, n. 1, p. 146-155, 2016.

OLIVEIRA B.C.de; CAETANO, G.A.deO.; CAETANO JÚNIOR, M.B.; MARTINS, T.R.; OLIVEIRA, C. B. de. Mecanismos reguladores de consumo em bovinos de corte. **Nutritime**, Brasil, v. 14, n. 4, 2017.

PEREIRA RA, FENSTERSEIFER S, BARCELOS VB, MARTINS CF, SCHNEIDER A, SCHMITT E, PFEIFER LFM, DEL PINO FAB, CORRÊA MN. Metabolic parameters and dry matter intake of ewes treated with butaphosphan and cyanocobalamin in the early postpartum period. **Small Ruminant Research**, Holanda, v.114, p.140–145. (2013)

RAINA, R.; GARG, G.; SETHI, S. K.; SCHREIBER, M. J.; SIMON, J. F. Phosphorus Metabolism. **Journal Nephrology and Therapeutics**, United States, v.3, p.2161-0959. 2012.

ROLLING E.; BERGHAUS R.D.; RAPNICKI P.; GODDEN S.M.; OVERTON M.W. The effect of injectable butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum serum beta hydroxybutyrate. Calcium, and phosphorus concentrations in dairy cattle. J**ournal of dairy science,** United States, v. 93, p.978–987. 2010.

SOUSA, J. M. S & MOREIRA, A. L. Consumo voluntário: regulação, modelos de predição e métodos de medição. **Nutritime,** Brasil, v. 14, n.2, 2017.

Graduação

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA

Saúde única

IV MOSTRA ACADÊMICA

PPGB

UTILIZAÇÃO DE BUTAFOSFAN NO COMPORTAMENTO ALIMENTAR E PRODUÇÃO DE VACAS LEITEIRAS NO PÓS-PARTO RECENTE

KAUANI BORGES CARDOSO[1]; CAMILA PIZONI[2]; ANTÔNIO AMARAL BARBOSA[2] ; JORDANI BORGES CARDOSO[2] ; EDUARDO SCHMITT[2]; MARCIO NUNES CORRÊA[3].



Período de transição

Mudanças nutricionais, imunes e metabólicas

BEN

↑Susceptibilidade dos animais à doenças

Utilização do Butafosfan



Busca por alternativas para diminuir os efeitos deletérios do BEN



OBJETIVO

Avaliar o efeito da aplicação de Butafosfan no comportamento alimentar e produção de vacas leiteiras no pós-parto recente.

CONCLUSÃO

A aplicação de Butafosfan diminuiu a IMS assim como de todos parâmetros de comportamento alimentar de vacas leiteiras no pós-parto recente sem alterar a produção de leite.

ENVOLVIMENTO DO SISTEMA SEROTONINÉRGICO NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA BENZAMIDA *N*-3-(FENILSELENIL)PROP-2-IN-1-ÍLICA EM CAMUNDONGOS

LEDEBUHR, KAUANE NAYARA BAHR[1*]; BESCKOW, EVELYN MIANES[1]; NUNES, GUSTAVO D'AVILA[1]; BALBOM, ÉVERTON BERWANGER[2]; GODOI, BENHUR[2]; BORTOLATTO, CRISTIANI FOLHARINI[1]; BRÜNING, CÉSAR AUGUSTO[1.]

[1] *Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular, Bioquímica/CCQFA – UFPEL (Universidade Federal de Pelotas) – knayara10@hotmail.com*
[2] *Núcleo de Síntese, Aplicação e Análise de Compostos Orgânicos e Inorgânicos (NUSAACOI), Universidade Federal da Fronteira Sul*

1. INTRODUÇÃO

A dor é um problema de saúde global, que além de acarretar sequelas múltiplas e graves, como depressão, incapacidade de trabalhar e relações sociais perturbadas, possui alto impacto socioeconômico (SILVA, 2013).Os medicamentos utilizados no tratamento da dor, por sua vez, não apresentam a eficácia desejada, além de apresentarem diversos efeitos colaterais, como problemas cardiovasculares e gastrointestinais, que induzem os pacientes a interromper o tratamento (YAKSH et al., 2015). Deste modo, fica claro a necessidade de maiores estudos na área e o desenvolvimento de novas moléculas com potencial terapêutico para alívio da dor.

Balbom e colaboradores desenvolveram o composto benzamida N-3(fenilselenil)prop-2-in-1-ílica (BS), que apresenta em sua formulação o núcleo benzamida, derivada do ácido benzoico, que possui efeitos farmacológicos já conhecidos (GURGU et al., 2017), e o elemento selênio, que apresenta diversos efeitos benéficos na saúde humana (PASCO et al., 2012; FEDERICO et al., 2012) . Compostos orgânicos contendo selênio têm sido investigados nos últimos anos e apresentado efeitos farmacológicos promissores (PINZ et al, 2016; SOUSA et al, 2017; BRÜNING et al, 2014; ROMAN et al, 2014). Em estudo prévio, a BS apresentou efeito antinociceptivo em modelos animais (LEDEBUHR, 2019).

Levando em consideração que a modulação da dor nociceptiva envolve várias estruturas cerebrais e diferentes sistemas de neurotransmissores, como o sistema serotoninérgico (MILLAN, 2002), e que diversos estudos têm associado os efeitos farmacológicos de compostos orgânicos de selênio ao sistema serotoninérgico (BRUNING et al. 2014; ANVERSA et al. 2018; SILVA et al. 2017; PINZ et al. 2016), este estudo avaliou o envolvimento dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} e 5-HT_3 no efeito antinociceptivo da BS.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados camundongos Swiss adultos, machos, entre 25-30g, do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas. Os mesmos foram mantidos a 22 ± 2ºC, em ciclo de 12h claro/12h escuro, até o momento das

análises comportamentais, com livre acesso a água e alimentos. Os experimentos foram conduzidos de acordo o Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da UFPel (CEEA 4903). A BS foi sintetizada no Núcleo de Síntese e Aplicação de Compostos Orgânicos e Inorgânicos (NUSAACOI), da Universidade Federal de Fronteira Sul (UFFS), de acordo com Balbom et al. (2018).

Para a avaliação do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo da BS, foram utilizados os antagonistas WAY100635 (0,5 mg/kg, via subcutânea), antagonista seletivo do receptor 5-HT_{1A}, e ondansetrona (0,5 mg/kg,via intraperitoneal), antagonista seletivo do receptor 5-HT_3. As doses utilizadas foram conforme outros artigos publicados (GONZÁLEZ-TRUJANO et al., 2019; SOUSA, et al., 2017). A BS foi administrada por via intragástrica aos camundongos na dose de 10 mg/kg. Todas as drogas foram dissolvidas em solução salina, exceto a BS que foi dissolvida em óleo de canola, e administradas em um volume constante de 10 ml/kg de peso corporal.

Como teste comportamental nociceptivo foi utilizado o teste da imersão da cauda, o qual se baseia na imersão da cauda do animal em água a 52ºC, e registro do tempo de resposta nociceptiva, indicada pela retirada da cauda. O teste foi realizado antes e após a administração das drogas, e os resultados foram comparados para obtenção de um valor delta de latência (JANSEN et al, 1963). Os antagonistas foram administrados 15 minutos antes do composto, e após 30 minutos da administração do mesmo o teste da imersão da cauda foi realizado.

As comparações entre os grupos experimentais foram realizadas pela análise de variância ANOVA de duas vias, acompanhada pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. Valores de probabilidade menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises foram realizadas no software GraphPad (GraphPad, San Diego, CA, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A BS aumentou a latência para a resposta nociceptiva no teste de imersão da cauda, demonstrando seu efeito antinociceptivo, e a pré-administração do WAY100635 bloqueou este efeito (Fig.1), o que indica que o receptor 5-HT_{1A} está envolvido no efeito antinociceptivo da BS.

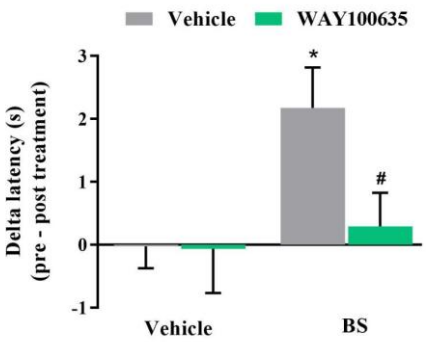


Figura 1. Efeito do WAY100635 na ação antinociceptiva da BS no teste de imersão da cauda. Os dados estão demonstrados como média ± erro padrão

da média. *p< 0,05 quando comparado ao grupo veículo e #p<0,05 quando comparado ao grupo BS. N: 8-10 animais por grupo.

O pré-tratamento dos camundongos com ondansetrona não bloqueou o efeito antinociceptivo da BS (Fig.2), o que demonstra que o receptor 5-HT_3 não está envolvido no efeito antinociceptivo da BS.

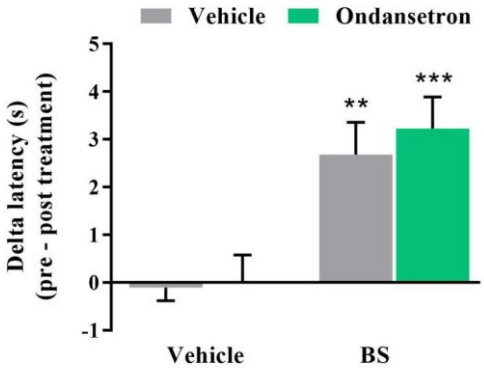


Figura 2. Efeito da ondansetrona na ação antinociceptiva da BS no teste de imersão da cauda. Os dados estão demonstrados como média ± erro padrão da média. **p< 0,01 e *** p<0,001 quando comparado ao grupo veículo. N: 9-10 animais por grupo.

4. CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram a participação do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo da BS, mais especificamente o receptor 5-$HT_{1A,}$ enquanto o receptor 5-HT_3 não apresentou associação com a atividade antinociceptiva da BS.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVERSA, R. G. et al, 2018. 'Antinociceptive and anti-inflammatory effects of 1,2-bis-(4 methoxyphenylselanyl) styrene in mice: involvement of the serotonergic system', *J Pharm Pharmacol*, 70: 901-09.

BALBOM, E. B. Síntese de benzamidas N-(3-Organocalcogenil)-2-propinílicas mediada por cul. 2018.

BRUNING, C. A. et al. Serotonergic systems are implicated in antinociceptive effect of m-trifluoromethyl diphenyl diselenide in the mouse glutamate test. Pharmacology Biochemistry and Behavior, v. 125, p. 15-20, 2014.

FEDERICO, A. et al. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. Journal of the neurological sciences, v. 322, n. 1-2, p. 254-262, 2012.

GONZÁLEZ-TRUJANO, M. E. et al. Identification of some bioactive metabolites and inhibitory receptors in the antinociceptive activity of Tagetes lucida Cav. Life sciences, v. 231, p. 116523, 2019.

GURGU, H. et al. Synthesis and biological evaluation of new N-(2-dimethylaminoethyl)-N-((un) substituted phenyl-2-(4-methyl/methoxy-phenoxymethyl) benzamides. metabolism, v. 12, p. 19, 2017.

JANSSEN, P. A. J. The inhibitory effect of fentanyl and other morphine-like analgesics on the warm water induced tactile withdrawal reflex in rat. Arzneimittelforschung, v. 13, p. 502-507, 1963.

LEDEBUHR, K. N. B. Avaliação do efeito antinociceptivo da benzamida N-3-(fenilselenil) prop -2-in-1-ílica em camundongos. 2019. 70f. Trabalho de conclusão de curso – Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. Progress in neurobiology, v. 66, n. 6, p. 355-474, 2002.

PASCO, J. A. et al. Dietary selenium and major depression: a nested case-control study. Complementary therapies in medicine, v. 20, n. 3, p. 119-123, 2012.

PINZ, M. et al., 2016. '4-Phenylselenyl-7-chloroquinoline, a new quinoline derivative containing selenium, has potential antinociceptive and anti-inflammatory actions', *Eur J Pharmacol*, 780: 122-8.

ROMAN M. et al., 2014. Selenium biochemistry and its role for human health. Metallomics : integrated biometal science 6: 25-54.

SILVA, M. A. S. et al. Pain assessment and training: the impact on pain control after cardiac surgery. Revista da Escola de Enfermagem da USP, v. 47, n. 1, p. 84-92, 2013.

SILVA, V. D. G. et al., 2017. 'Further analysis of acute antinociceptive and anti-inflammatory actions of 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline in mice', *Fundam Clin Pharmacol*, 31: 513-25.

SOUSA, F. S. S. et al., 2017. Evaluation of Se-phenyl-thiazolidine-4-carboselenoate protective activity against oxidative and behavioral stress in the maniac model induced by ouabain in male rats. Neuroscience letters, v. 651, p. 182-187.

YAKSH, T. L. et al. The search for novel analgesics: targets and mechanisms. F1000prime reports, v. 7, 2015.

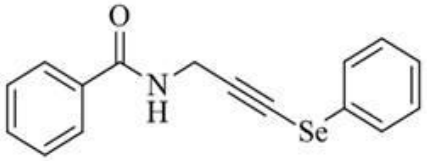
VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA

Saúde única

IV MOSTRA ACADÊMICA

ENVOLVIMENTO DO SISTEMA SEROTONINÉRGICO NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA BENZAMIDA N-3-(FENILSELENIL)PROP-2-IN-1-ÍLICA EM CAMUNDONGOS

LEDEBUHR, KAUANE NAYARA BAHR[1*]; BESCKOW, EVELYN MIANES[1]; NUNES, GUSTAVO D'AVILA[1]; BALBOM, ÉVERTON BERWANGER[2]; GODOI, BENHUR[2]; BORTOLATTO, CRISTIANI FOLHARINI[1]; BRÜNING, CÉSAR AUGUSTO[1].



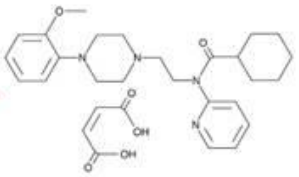
Benzamida N-3 (fenilselenil) prop-2-in-1-ílica (BS)

DOR

Hipótese: possui ligação com o sistema serotoninergico

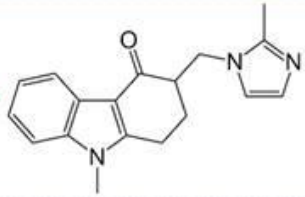
TESTE COMPORTAMENTAL





WAY100635 (0,5 mg/kg, via subcutânea), antagonista seletivo do receptor 5-HT1A

Bloqueia o efeito antinociceptivo da BS



Ondansetrona (0,5 mg/kg,via intraperitoneal), antagonista seletivo do receptor 5-HT3

Não bloqueia o efeito antinociceptivo da BS

BS

JANSSEN, P. A. J. The inhibitory effect of fentanyl and other morphine-like analgesics on the warm water induced tactile withdrawal reflex in rat. Arzneimittelforschung, v. 13, p. 502-507, 1963.

LEDEBUHR, K. N. B. Avaliação do efeito antinociceptivo da benzamida N-3-(fenilselenil) prop -2-in-1-ilica em camundongos. 2019. 70f. Trabalho de conclusão de curso – Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

ISOLAMENTO DE UMA CEPA PROBIÓTICA DO GÊNERO *Bacillus* NATIVA DO TRATO INTESTINAL DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* COM POTENCIAL PARA APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

LAURA DALL'AGNO[1]; JADE RIET[2]; JÉSSICA LUCINDA SALDANHA DA SILVA[3]; OSCARINA VIANA DE SOUSA[4]; WILSON WASIELESKY[5]; LUIS FERNANDO MARINS[6]

[1]Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – lauradallagno@hotmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – jaderiet@hotmail.com
[3]Universidade Federal do Ceará (UFC) – jessicalucinda@hotmail.com
[4]Universidade Federal do Ceará (UFC) – oscarinaviana@hotmail.com
[5]Universidade Federal do Rio Grande (FURG) – manow@mikrus.com.br
[6]Universidade Federal do Rio Grande (FURG) – dqmluf@furg.br

1. INTRODUÇÃO

A carcinocultura é uma das principais atividades dentro da aquacultura, sendo o camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, o crustáceo mais produzido comercialmente (FAO, 2020). Com o contínuo desenvolvimento do setor aquícola, doenças causadas por vírus e bactérias se tornaram cada vez mais frequentes (SHEN et al., 2010). Dessa forma, o uso imunoprofilático de probióticos na aquacultura, como os do gênero *Bacillus,* tornou-se uma alternativa popular e sustentável ao uso de antibióticos em ambientes de cultivo, já que além de inofensivos aos camarões, possuem propriedades benéficas, promovendo a melhora da resposta imune e qualidade da água, auxiliando na digestão, protegendo contra patógenos e promovendo o crescimento e reprodução (BANERJEE; RAY, 2017; ZUO et al., 2018). Além disso, o isolamento de cepas nativas do trato intestinal de animais saudáveis se tornou uma forma eficaz de buscar por probióticos, já que evita as dificuldades de colonização, além de não perturbar a comunidade microbiana natural (BANERJEE; RAY, 2017).

De acordo com VIEIRA; PEREIRA (2016) e BANERJEE; RAY (2017), um candidato a probiótico bem sucedido deve dispor de alguns critérios específicos, que visam melhorar a saúde dos animais. Assim, a cepa bacteriana selecionada não deve ser patogênica. Além disso, suscetibilidade a antibióticos, a fim de evitar a transferência horizontal de genes de resistência, tolerância a níveis de pH, habilidade de colonização do trato intestinal, atividade antagônica frente a patógenos e produção de enzimas extracelulares, como proteases e amilases, são igualmente importantes a um candidato a probiótico.

Um fator fundamental frente ao crescimento da aquacultura é o desenvolvimento de tecnologias que facilitem a produção, como o combate às doenças e a melhora na eficiência do consumo de rações formuladas com proteínas vegetais. As cepas probióticas vêm, então, se mostrando como uma possibilidade para a produção de compostos de importância biotecnológica, já que podem ser geneticamente manipuladas para a produção de moléculas heterólogas (SANTOS et al., 2019a).

Assim, a seleção de estirpes nativas do trato intestinal passíveis de manipulação genética é uma alternativa ao uso de bactérias comerciais comumente isoladas do solo, já que estão aderidas ao trato intestinal dos animais e adaptadas a microbiota nativa. Frente a isso, o presente trabalho teve como objetivo a triagem de cepas probióticas do gênero *Bacillus,* nativas do trato intestinal do camarão *L. vannamei,* com potencial para manipulação genética.

2. METODOLOGIA

Camarões da espécie *L. vannamei* foram alocados em um tanque e mantidos por um período de dois dias sem suprimento alimentar. Após, foram finalizados por hipotermia e assepsiados para remoção dos intestinos. Os intestinos foram armazenados em NaCl 0,9% e plaqueados em Meio Luria-Bertani (LB) a fim de analisar a morfologia das cepas presentes. Foram escolhidos e isolados os morfotipos observados em maior frequência nas placas. A técnica de coloração de Gram foi utilizada para caracterização morfológica e, para a identificação taxonômica, o DNA das colônias foi extraído e utilizado para Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a fim de amplificar o gene *rnc* (RNAse tipo III), por ser um gene variável entre as espécies de *Bacillus*. Os fragmentos amplificados foram purificados, sequenciados e alinhados com sequências disponíveis no banco de dados GenBank do National Center for Biotechnology Information (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando o programa BLAST.

Dentre as cepas isoladas do trato intestinal dos camarões, foi escolhida aquela pertencente ao gênero *Bacillus*. A caracterização probiótica foi realizada no Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP - UFC), onde foram avaliadas as características fenotípicas do isolado bacteriano, como a produção de exopolissacarídeos e aderência; enzimáticas, através da atividade das enzimas caseinase, gelatinase, celulase, amilase e β-hemólise; tolerância à variação de temperatura (4 e 40ºC), pH (5,0 e 9,0) e salinidade (0, 30 e 80 ppm); suscetibilidade frente aos antibióticos ácido nalidíxico, cloranfenicol, florfenicol e oxitetraciclina na concentração de 30 µg; e teste de antagonismo frente aos patógenos *Vibrio harveyi* e *Vibrio parahaemolyticus*. A cepa isolada também foi avaliada quanto ao crescimento em meio de cultura LB comercial e suscetibilidade à transformação genética.

A manipulação genética foi realizada através do plasmídeo pJJ5 que contém os gene *spc* e *Phy-Af*, conferindo resistência ao antibiótico espectinomicina e codificando para a enzima fitase, respectivamente (SANTOS et al., 2019b). Foi usado o protocolo de competência e transformação utilizando o meio *minimal salts* de acordo com o método de ANAGNOSTOPOULOS; SPIZIZEN (1961). Para confirmação da manipulação genética, o DNA da estirpe foi extraído e utilizado para PCR, com um par de *primers* anelando no gene da fitase.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas e sequenciadas quatro cepas bacterianas presentes no trato intestinal de camarões *L. vannamei*, todas classificadas como Gram-

positivas pela identificação morfotintorial. Dentre elas, uma apresentou 100% de similaridade com *Bacillus subtilis* para o gene *rnc*, espécie reconhecida como segura pela lista Generally Recognized as Safe (GRAS) e escolhida para caracterização probiótica.

A cepa bacteriana não apresentou atividade hemolítica, nem expressou gelatinase, sendo considerada como um organismo não patogênico. Da mesma forma, foi capaz de produzir enzimas extracelulares, como caseinase e amilase. A habilidade de produzir enzimas extracelulares é um fator positivo aos candidatos a probióticos, já que torna os compostos biodisponíveis auxiliando no suporte nutricional dos hospedeiros (BANERJEE; RAY, 2017).

A cepa bacteriana isolada também demonstrou eficácia quanto à aderência em substratos e tolerância a variações ambientais, suportando alta temperatura (40ºC), nível de pH básico (9,0) e diferentes concentrações de salinidade (0, 30 e 80 ppm). A capacidade de aderência é uma característica importante em candidatos probióticos, visto que já é bem estabelecido que bactérias capazes de colonizar a superfície da mucosa intestinal são mais cruciais na manutenção da nutrição, fisiologia e imunidade animal do que aquelas de vida livre (BANERJEE; RAY, 2017). Além disso, o fato da cepa demonstrar uma boa estabilidade frente a diferentes estresses ambientais, como temperatura, pH e salinidade, possibilita a sua utilização em diferentes condições de cultivos.

Quando exposta a duas cepas patogênicas de *Vibrio*, *V. harveyi* e *V. parahaemolyticus*, a estirpe manifestou atividade antagônica positiva, impedindo o crescimento dos patógenos. Segundo BANERJEE; RAY (2017), a atividade inibitória frente a uma ampla variedade de patógenos é a principal propriedade de um candidato a probiótico de sucesso. Igualmente, a cepa foi capaz de crescer em meio comercial e se mostrou suscetível a todos os antibióticos testados, critério importante para evitar a transferência horizontal de genes contendo resistência a antibióticos dentro dos cultivos.

A cepa também demonstrou suscetibilidade à transformação genética. Frente a essa possibilidade de manipulação genética em uma cepa nativa do camarão *L. vannamei*, surge a perspectiva de produção de moléculas heterólogas de importância biotecnológica, como fitases recombinantes, a fim de melhorar a eficiência de consumo de rações de origem vegetal, como demonstrado por SANTOS et al. (2019a).

4. CONCLUSÕES

O uso de uma cepa probiótica nativa do trato intestinal do camarão não somente é uma alternativa mais sustentável ao uso de antibióticos no setor aquícola, como também, por estar aderida e adaptada à flora intestinal do hospedeiro, tem uma vantagem em relação aos probióticos comerciais comumente isolados do ambiente. Assim, os próximos passos do trabalho compreendem o sequenciamento do genoma bacteriano e experimentos *in vivo*, ofertando o probiótico manipulado geneticamente aos camarões e verificando a atividade da fitase, por exemplo, nos sistemas de cultivo, além da avaliação dos parâmetros zootécnicos dos animais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANAGNOSTOPOULOS, C.; SPIZIZEN, J. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 81, n. 5, p. 741–746, 1961.

BANERJEE, G.; RAY, A.K. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. **Research in Veterinary Science**, v. 115, p. 66–77, 2017.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Roma, 2020.

SANTOS, K.O.; COSTA-FILHO, J.; RIET, J.; SPAGNOL, K.L.; NORNBERG, B.F.; KÜTTER, M.T.; TESSER, M.B.; MARINS, L.F. Probiotic expressing heterologous phytase improves the immune system and attenuates inflammatory response in zebrafish fed with a diet rich in soybean meal. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 93, p. 652–658, 2019a.

SANTOS, K.O.; COSTA-FILHO, J.; SPAGNOL, K.L.; MARINS, LF. Comparing methods of genetic manipulation in *Bacillus subtilis* for expression of recombinant enzyme: Replicative or integrative (CRISPR-Cas9) plasmid? **Journal of Microbiological Methods**, v. 164, p. 105667, 2019b.

SHEN, W.Y.; FU, L.L.; LI, W.F; ZHU, Y.R. Effect of dietary supplementation with *Bacillus subtilis* on the growth, performance, immune response and antioxidant activities of the shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture Research**, v. 41, n. 11, p. 1691–1698, 2010.

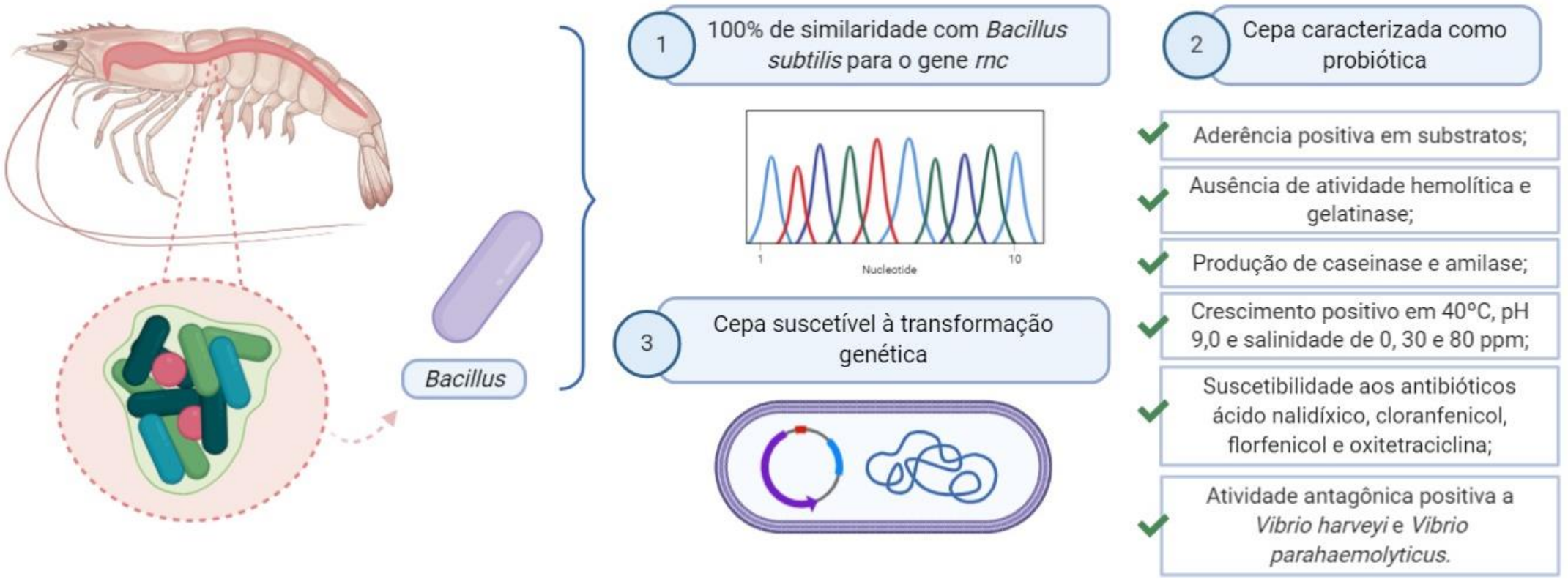
VIEIRA, B.B.; PEREIRA, E.L. Potential probiotics for use in aquaculture. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 14, n. 2, p. 1223–1241, 2016.

ZUO, Z.; SHANG, B.; SHAO, Y.; Li, W.; SUN, J. Screening of intestinal probiotics and the effects of feeding probiotics on the growth, immune, digestive enzyme activity and intestinal flora of *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 86, p. 160–168, 2018.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

ISOLAMENTO DE UMA CEPA PROBIÓTICA DO GÊNERO *Bacillus* NATIVA DO TRATO INTESTINAL DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* COM POTENCIAL PARA APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

LAURA DALL'AGNO[1]; JADE RIET[2]; JÉSSICA LUCINDA SALDANHA DA SILVA[3]; OSCARINA VIANA DE SOUSA[4]; WILSON WASIELESKY[5]; LUIS FERNANDO MARINS[6]



Criado com BioRender.com

ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS COM ADIÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS E AUMENTO DA QUALIDADE DA CARNE

LAURA DE VASCONCELOS COSTA[1];ELESSANDRA ZAVAREZE[2]; ADRIANA DILLENBURG MEINHART[3]

[1]Universidade Federal de Pelotas – lauravcosta98@hotmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas – elessandrad@yahoo.com.br
[3]Universidade Federal de Pelotas – admeinhart@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A avicultura se destaca nos cenários nacional e internacional pelo crescimento da produção e consumo da carne de frango (SCHMITT, 2019). Em uma pesquisa feita por FRANCISCO et al. (2007) foi observado que a carne de frango é a carne mais apreciada pelos consumidores, depois da carne bovina. Em 2019, a produção brasileira foi de 13.245 mil toneladas, sendo 68,0% destinados para o mercado interno e 32,0 % para exportações. O Brasil é o maior exportador mundial de carne de frango, chegando em 2019 a exportar 4.214 mil toneladas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL, 2020).

A carne de frango fornece nutrientes necessários em dietas equilibradas, como proteínas, lipídios, vitaminas e minerais que são encontrados em sua composição (VENTURINI et al., 2007). A qualidade da carne é dependente da raça, idade, condições de saúde do animal, temperatura do tecido muscular e velocidade de resfriamento após o abate, (VENTURINI et al., 2007, VIEIRA, 1999), aporte hídrico durante o crescimento e, essencialmente, da alimentação do animal.

Diversas pesquisas vêm sendo realizadas, mostrando que quando adicionadas matrizes com elevado teor de compostos bioativos à ração animal são observadas melhorias significativas na qualidade nutricional e microbiológica da carne e produtos derivados. CAMPOS et al. (2007) demonstraram que a atividade antioxidante apresentada pelo extrato de erva-mate, quando adicionado ao salame, foi capaz de inibir a oxidação lipídica e a adição de resíduo da poda de erva-mate na dieta de bovinos leiteiros, teve o intuito de melhorar a nutrição animal (CHAVES, 2014; CUNHA et al., 2019).

Considerando que há estudos (LIPORI, 2019; OLIVEIRA, 2019) que demonstram resultados satisfatórios quanto à adição de compostos bioativos em ração de frangos, este trabalho julga útil a abordagem sobre o referido tema. Além disso a carne de frango possui quantidade relevante de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) em sua composição, o que a torna altamente susceptível à peroxidação lipídica, mesmo quando conservada sob refrigeração ou congelamento. Essa condição pode ser minimizada por meio da adição de substâncias antioxidantes naturais ou sintéticas na ração das aves (OLIVEIRA, 2019). A dieta é um dos fatores que tem interferência direta na qualidade da

carne, estudos demonstraram que dietas influenciam tanto características sensoriais da carne como flavor, coloração e oxidação lipídica (SCHMITT, 2019).

2. METODOLOGIA

A presente revisão foi realizada através de pesquisas feitas nas bases de dados Google Scholar e Science direct. As palavras buscadas no Google Scholar foram “chicken phenolic ration” (de 01 janeiro de 2016 até 16 de julho de 2020) e “frango ração bioativo” (de 01 de janeiro de 2019 até 16 de julho de 2020). As palavras pesquisadas no Science Direct, no dia 21/07/2020 foram “phenolic chicken” (de 01 de janeiro de 2019 até 21 de julho de 2020).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Existe uma série de estudos relacionados à adição de matrizes com elevada quantidade de compostos bioativos na ração para alimentação de frangos. LIPORI (2019) estudou a adição de matrizes ricas em compostos bioativos na alimentação de frangos de corte e galinhas poedeiras. O estudo investigou o efeito da adição de várias plantas: 1) Folhas de erva mate moídas (*Ilex paraguariensis*); 2) Folhas de chá verde (*Camellia Sinensis*) moídas; 3) Hibisco moído (*Hibiscus sabdariffa L.*), cuja parte empregada foi o cálice do fruto seco; e 4) Folhas de stévia (*Stevia rebaudiana*) moídas. O pesquisador analisou o desempenho em relação ao perfil bioquímico sérico, peso dos órgãos, morfologia intestinal, sistema imune, qualidade e oxidação lipídica, qualidade dos ovos e oxidação lipídica da gema dos ovos. O autor concluiu que o uso de folha moída de erva-mate na alimentação de frangos de corte durante a fase de 1 a 21 dias de idade melhorou a morfometria intestinal e a conversão alimentar e reduziu o estresse das aves. Além disso, folhas moídas de chá verde e hibisco se mostraram aditivos importantes para melhorar o sistema imune humoral. LIPORI (2019) também estudou a adição destes componentes na alimentação de frangos de corte na fase final (aves sacrificadas aos 42 dias de idade) e concluiu que a adição de erva-mate, chá verde e hibisco diminuíram o consumo de ração e ganho de peso. A suplementação com pó de erva-mate e chá verde melhorou a qualidade da carne, aumentando a capacidade de retenção de água da carne do peito.

OLIVEIRA (2019) adicionou farelo de acerola (FAC) na ração de frangos de corte e alimentou-os durante 42 dias. Em seguida, foi realizada a evisceração dos mesmos e o músculo do peito e da coxa foram analisados. A pesquisadora observou que a adição de FAC retardou a peroxidação lipídica do peito, sem interferir na cor. OLIVEIRA (2019) também fez um estudo com hamburgueres preparados com a carne do peito dos frangos e obteve produtos com menor teor de colesterol, com propriedades físicas e bromatológicas preservadas, além de análise sensorial obtendo altos índices de aceitação e intenção de compra.

GALLI et al. (2019) adicionaram extratos de curcumina, carvacrol, timol e cinamaldeído na ração de frangos de cortes. E obteve como resultado que a curcumina, o carvacrol, timol e cinamaldeído podem ser incorporados na ração para animais, substituindo os promotores de crescimento convencionais. Esses

aditivos geraram melhora na carne (através do aumento do teor de ácidos graxos poli-insaturados) e aumentou a vida útil da carne.

Em um estudo realizado por FORTUOSO et al. (2019), 240 frangos tiveram uma dieta baseada em farelo de milho e soja, recebendo diferentes níveis de monolaurato de glicerol. Os animais foram pesados nos dias 1, 7, 21, 35 e 42 de vida, sendo o ganho de peso determinado ao final do experimento. O autor realizou análises de sangue, bioquímicas, físico-químicas da carne, exame fecal, contagem bacteriana total e histopatologia. Ele concluiu que, o monolaurato de glicerol pode ser utilizado como substituto de bacitracina de zinco, tendo encontrado em seu estudo efeitos positivos no crescimento de frangos. Essa substituição causou melhora na saúde intestinal, maior ganho de peso, não apresentou toxicidade no sangue e aumentou as moléculas associadas à imunidade dos frangos.

4. CONCLUSÕES

A carne de frango é a mais apreciada pelos consumidores, depois da carne bovina. A dieta é um dos fatores que tem interferência direta na qualidade da carne. Compostos bioativos adicionados na ração animal podem fornecer melhorias na qualidade nutricional e microbiológica da carne. Considerando que estudos com adição de compostos bioativos na ração de animais demonstraram benefícios como melhora na qualidade da carne, melhora no ganho de peso, no sistema imune e aumento de vida útil de produtos com carne de frango. Os autores salientam a cerca da importância da abordagem deste tema em pesquisas futuras, à fim de proporcionar um incremento significativo na qualidade da dieta da população através de um alimento com elevado índice de consumo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL – ABPA. **Estatística do setor**. 2019. Acesso em: 28 de abr. 2020. Disponível em: https://abpa-br.org/mercados/.

CAMPOS, R. M. L.; HIERRO, E.; ORDÓÑES, J. A.; BERTOL, T. M.; TERRA, N. N.; HOZ, L. DE LA. Fatty acid and volatile compounds from salami manufactured with yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract and pork back fat and meat from pigs fed on diets with partial replacement of maize with rice bran. Food Chemistry, v. 103, p.1159-1167, 2007.

CHAVES, B.W. Utilização de resíduos industriais na dieta de bovinos leiteiros. Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental, v. 18, p. 150-156, 2014.

CUNHA, A. B.; CARVALHO, C. A.; BUSS, R.; WALTRICK, D. B.; BARNASKY, R. R. S.; HENNE, R. A.; ANTUNES, R. Potential for use of wastes of yerba mate

(*Ilex paraguariensis*) processing in the production os particle boards. Scientia Forestalis, v. 47, n. 124, p. 724-732, 2019.

FORTUOSO, B. F.; REIS, J. H. Dos.; GEBERT, R. R.; BARRETA, M.; GRISS, L. G.; CASAGRANDE, R. A.; CRISTO, T. G. De.; SANTIANI, F.; CAMPIGOTTO, G.; RAMPAZZO, L.; STEFANI, L. M.; BOIAGO, M. M.; LOPES, L. Q.; SANTOS, R. C. V.; BALDISSERA, M. D.; ZANETTE, R. A.; TOMASI, T. SILVA, A. S. Da. Glycerol monolaurate in the diet of broiler chickens replacing conventional antimicrobials: Impact on health, performance and meat quality. Microbial Pathogenesis, v. 129, p. 161–167, 2019.

FRANCISCO, D. C.; NASCIMENTO, V. P.; LOGUERCIO, A. P.; CAMARGO, L. Caracterização do consumidor de carne de frango da cidade de Porto Alegre. Ciência Rural, v.37, n.1, p.253-258, 2007.

GALLI, G. M.; GERBET, R. R.; GRISS, L. G.; FORTUOSO, B. F.; PETROLLI, T. G.; BOIAGO, M. M.; SOUZA, C. F.; BALDISSERA, M. D.; MESADRI, J.; WAGNER, R.; ROSA, G. Da.; MENDES, R. E.; GRIS, A.; SILVA, A. S. Da. Combination of herbal components (curcumin, carvacrol, thymol, cinnamaldehyde) in broiler chicken feed: impacts on response parameters, performance, fatty acid profiles, meat quality and control of coccidia and bacteria. Microbial Pathogenesis, In Press DOI: 10.1016/j.micpath.2019.103916, 2019.

LIPORI, H. M. Aditivos fitogênicos na alimentação de frangos de corte e poedeiras comerciais. Universidade Estadual de Maringá. Centro de ciências agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de concentração: Produção Animal. Maringá, 2019.

OLIVEIRA, J. De. Efeitos do uso de farelo de acerola na dieta de frangos de corte sobre as características de qualidade da carne e do hambúrguer. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de medicina veterinária. Campus de Araçatuba. Araçatuba, 2019.

SCHMITT, J. Qualidade da carne de frangos de corte submetidos a diferentes níveis de bagaço de uva na dieta. Universidade Federal de Santa Maria. Centro de ciências rurais, Programa de pós-graduação em ciência e tecnologia dos alimentos. Santa Maria, 2019.

VENTURINI, K. S.; SARCINELLI, M. F.; SILVA, L. C. Características da carne de frango. Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Pró-Reitoria de Extensão - Programa Institucional de Extensão. Boletim Técnico - PIE-UFES:01307 - Editado: 18.08.2007, 2007.

Vieira, S.L. **Conceitos atuais de qualidade em produtos de frango:** Efeito da nutrição inicial. Simpósio Internacional de Tecnologia, Processamento e Qualidade da Carne de Aves, Anais, Concórdia: Embrapa, p. 60-68, 1999.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS COM ADIÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS E AUMENTO DA QUALIDADE DA CARNE

LAURA DE VASCONCELOS COSTA[1];ELESSANDRA ZAVAREZE[2]; ADRIANA DILLENBURG MEINHART[3]

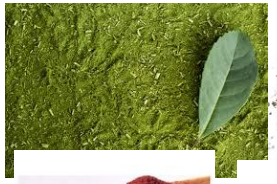




Google Scholar

ScienceDirect

Folhas de erva-mate



Folhas de chá verde





Hibisco moído



Folhas de Stévia

Reduziu o estresse

Melhorou a qualidade da carne de frango

Farelo de acerola



Retardou peroxidação lipídica

Produtos com menor teor de colesterol

Extratos de curcumina, carvacrol, timol e cinamaldeído

Compostos majoritários em orégano e tomilho

Aumentou teor de ácidos graxos poli-insaturados e vida útil da carne

Monolaurato de glicerol

Aditivo

Pode impedir crescimento de microrganismos

+ Crescimento

↑ Moléculas associadas à imunidade

↑ Ganho de peso

Agradecimentos: CAPES FAPERGS

Produção de vacinas por meio de plantas transgênicas: Prospecção tecnológica

BRUNARA EVELY DE ARAUJO LIMA[1], MARIA CAROLINA ALVES DA SILVA[2], DANIELA DA SILVA SOUZA[3], MICHELY CORREIA DINIZ[4]

[1,2,3]*Universidade Federal do Vale do São Francisco – E-mail para contato: brunara.evely@hotmail.com.*
[4]*Universidade Federal do Vale do São Francisco –michely.diniz@univasf.edu.br*

1. INTRODUÇÃO

Dentre as principais aplicações das plantas transgênicas para a área da saúde, pode-se citar a produção de vacinas. Inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas, tanto no enfoque da produção e purificação de antígenos produzidos a partir de plantas quanto da administração direta de alimentos transgênicos, sem a necessidade de purificação e processamento (SOARES-COSTA *et al*, 2017).

Ao se produzir uma vacina em plantas, exclui-se o risco de vacinas formuladas a partir da atividade patogênica atenuada ou inativada de vírus, pois para a produção recombinante do antígeno, utiliza-se somente uma porção do organismo que se acredita ser capaz de induzir a produção de anticorpos. Além disso, as plantas apresentam a vantagem da produção em larga escala, reduzido custo de produção e possibilidade de administração oral de alimentos contendo a concentração suficiente de antígenos (OBEMBE *et al*, 2011).

Atualmente, há várias proteínas recombinantes expressas por plantas transgênicas em comercialização nas áreas da cosmética, da veterinária e para fins de diagnóstico havendo ainda poucas com aplicação terapêutica em humanos (FILIPE, 2015). Alguns exemplos são: o colágeno, expresso em tabaco transgênico, é utilizado pela indústria cosmética e tem vantagem de não conter toxinas de origem animal. o α-interferon canino, produzido em morangos transgênicos, apresenta poucos custos de purificação e de produção. A aprotinina, expressa em tabaco transgênico, é utilizada como reagente de laboratório (SACK, HOUFBAUER, FISCHER E STOGER, 2015).

Este trabalho objetiva realizar uma prospecção tecnológica de patentes relacionadas a produção de vacinas através de plantas transgênicas, utilizando banco de dados nacionais e internacionais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A coleta de dados foi realizada em agosto de 2020, e foram usados diferentes métodos de busca de acordo com o banco de dados. Em cada base de dados foram realizadas duas pesquisas, uma para termo “Vacinas plantas transgênicas” e uma para “Plantas transgênicas”, com o propósito de ter um resultado amplo de pedidos de patentes relacionadas ao uso de plantas transgênicas.

A pesquisa feita no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) foi realizada na busca básica e na busca avançada para todos os dois termos no resumo, afim de resultados mais precisos.

Já no *European Patent Office* (EPO) e *World Intellectual Property Organization* (WIPO), foi efetuada uma busca básica para os termos: *Vaccines transgenic plants* e *transgenic plants*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos depósitos de patentes podem ser vistos na Tabela 1. No INPI foi encontrada na busca básica um total de 680 pedidos de patentes e 13.983 na avançada.

Nos bancos de dados *WIPO* e *EPO* foram realizadas somente buscas básicas, sendo o WIPO o banco com maior número de patentes depositadas cerca de 287.521 pedidos, enquanto no site *EPO* foram encontrados um total de 88.023 patentes.

Tabela 1 – Distribuição de Patentes em banco de dados.

	Vacinas plantas transgênicas	**Plantas transgênicas**	***Vaccines transgenic plants***	***Transgenic plants***
INPI				
Básico	2	678	-	-
Avançada	7590	6393	-	-
WIPO	-	-	61833	225688
EPO	-	-	8328	79695

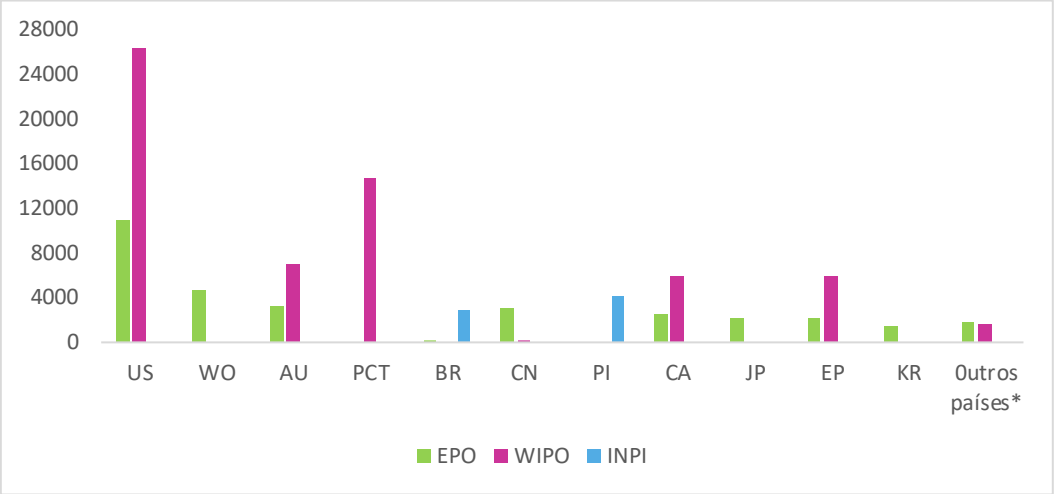
Fonte: Autoria própria (2020).

3.1 DISTRIBUIÇÃO DE PATENTES POR PAÍS

Através das buscas foi possível obter a distribuição mundial e nacional, respectivamente, dessas patentes (Gráfico 1). Pode-se observar que o país com mais registros no banco internacional são os Estados Unidos com 37.236 patentes depositadas, e já no banco nacional, com 4.220 patentes.

Gráfico 1. Distribuição de patentes por países. US- Estados Unidos, WO- Organização Mundial da Propriedade Intelectual, AU- Austrália, PCT- Tratado de Cooperação Matéria de Patentes, BR- Brasil, CN- China, PI- Propriedade intelectual, CA- Canadá, JP- Japão, EP- Organização Europeia de Patentes, KR- República da Coreia. Outros países incluem Espanha, Singapura, Nova Zelândia, Tailândia, Federação Russa, Portugal, Organização Euroasiática de

Patentes, Israel, Reino Unido, África do Sul e Noruega que detém menos de 500 patentes.



Fonte: Autoria própria (2020).

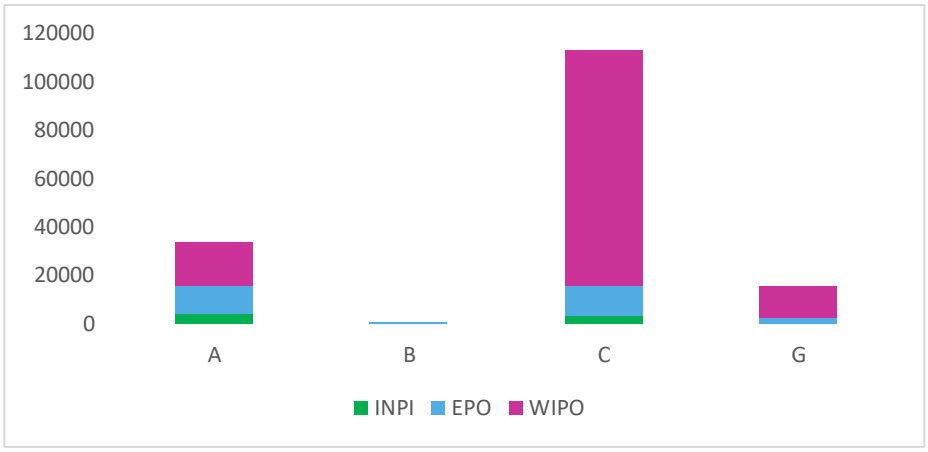
3.2.CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL DE PATENTES (CIP)

A classificação internacional de patentes tem a finalidade de organizar os documentos de pedidos de patentes, com o propósito de simplificar a busca dos dados durante as pesquisas. Essa classificação é baseada na divisão de classes de A a H, compreendendo diversas áreas, como por exemplo necessidades humanas e física, e essas classes ainda podem apresentar várias outras subdivisões (INPI, 2019).

A CIP divide o conhecimento tecnológico em oito Grandes Áreas ou Seções: A- Necessidades Humanas; B- Operações de Processamento, Transporte; C- Química e Metalurgia; D- Têxteis e Papel; E- Construções Fixas; F- Eng. Mecânica, Iluminação, Aquecimento, Armas, Explosão; G– Física; e H– Eletricidade.

Utilizando esse sistema de classificação dos dados, as patentes que foram encontradas, usando como descritor “vacinas de plantas transgênicas”, fazem parte das classes A, B, C e G onde, estão representadas na tabela 2.

Tabela 2. Seção das patentes. A- Necessidades Humanas, B- Operações de Processamento, Transporte; C- Química e Metalurgia e G– Física.



Fonte: Autoria própria (2020).

4. CONCLUSÕES

Observa-se uma grande quantidade de pesquisas e patentes relacionadas a aplicações tanto industriais quanto terapêuticas de proteínas e vacinas produzidas em plantas transgênicas, porém poucas geram produtos para o mercado consumidor. Dessa forma, são necessários mais pesquisas e testes para que seja possível incorporar cada vez mais produtos recombinantes ao cotidiano.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FILIPE, Ana Patrícia da Costa. Produção de proteínas recombinantes por plantas transgénicas. 2015. Tese de Doutorado.

OBEMBE OO, Popoola J.O., Leelavathi S., Reddy S.V. Advances in plant molecular farming. **Biotechnology Advances**. 2011; 29:210-22.

SACK, Markus et al. The increasing value of plant-made proteins. **Current opinion in biotechnology**, v. 32, p. 163-170, 2015.

SOARES-COSTA, Andrea; Schneider, V.K.; Nakayama, D.G.; Arencibia, A.D.; Henrique-Silva, F; "Plantas transgênicas: fundamentos, métodos de produção e aplicações", p. 649 -674. In: **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria** - Vol. 4. São Paulo: Blucher, 2017.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

Produção de vacinas por meio de plantas transgênicas: Prospecção tecnológica

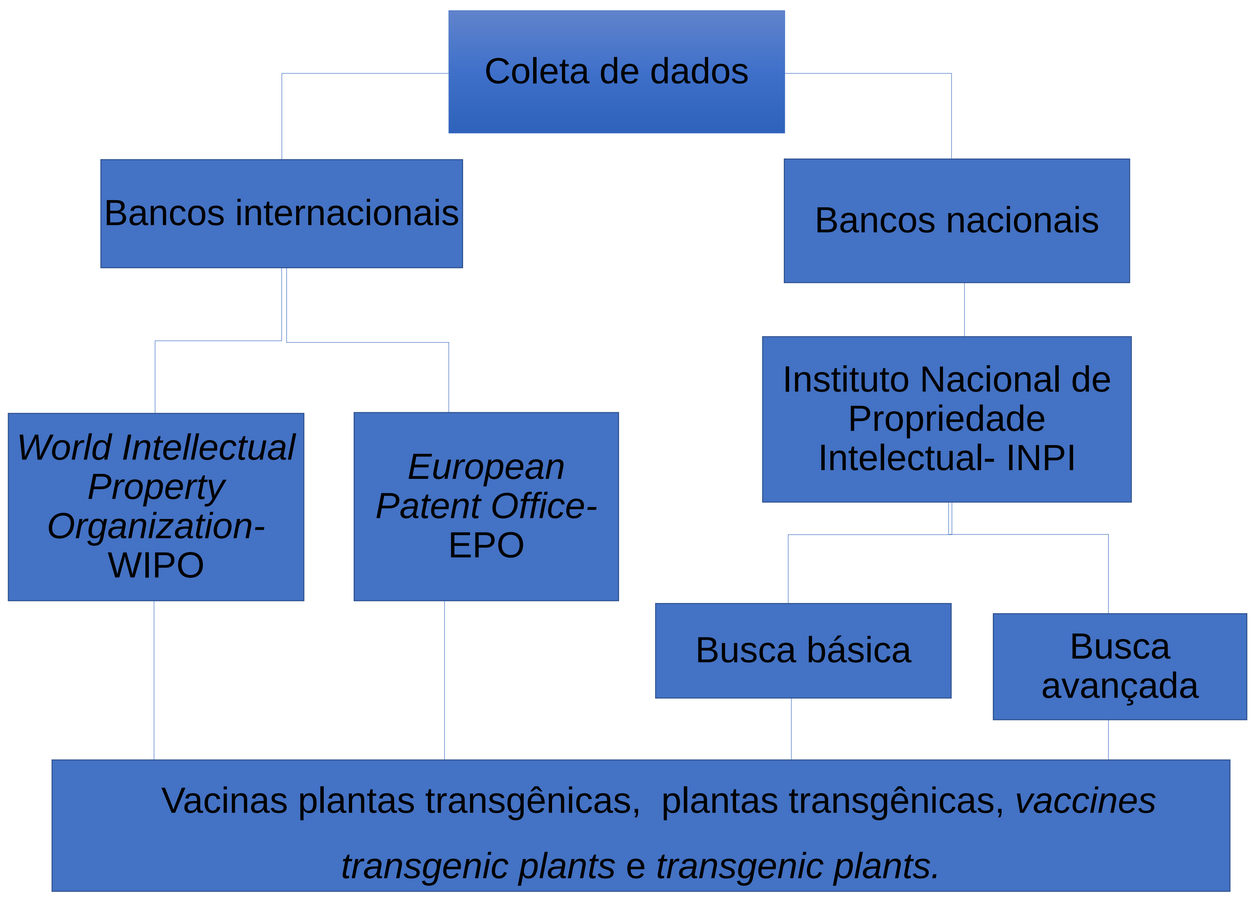
BRUNARA EVELY DE ARAUJO LIMA[1]; MARIA CAROLINA ALVES DA SILVA[2], DANIELA SILVA SOUZA[3], MICHELY CORREIA DINIZ[4]

[1,2,3] Universidade Federal do Vale do São Francisco, Graduando em Ciências Biológicas (UNIVASF), Petrolina-PE.
E-mail para o contato: brunara.evely@hotmail.com
[2] Universidade Federal do Vale do São Francisco, Docente do curso de Ciências Biológicas (UNIVASF), Petrolina-PE. GEIS - Grupo de Estudos Integrados do Semiárido.

INTRODUÇÃO

- As plantas transgênicas são organismos geneticamente modificados (TORRES,1998).
- Dentre as principais aplicações das plantas transgênicas para a área da saúde, pode-se citar a produção de vacinas (SOARES-COSTA et al, 2017).
- O trabalho tem como objetivo realizar uma prospecção tecnológica de patentes relacionadas a produção de vacinas através de plantas transgênicas, utilizando banco de dados nacionais e internacionais.

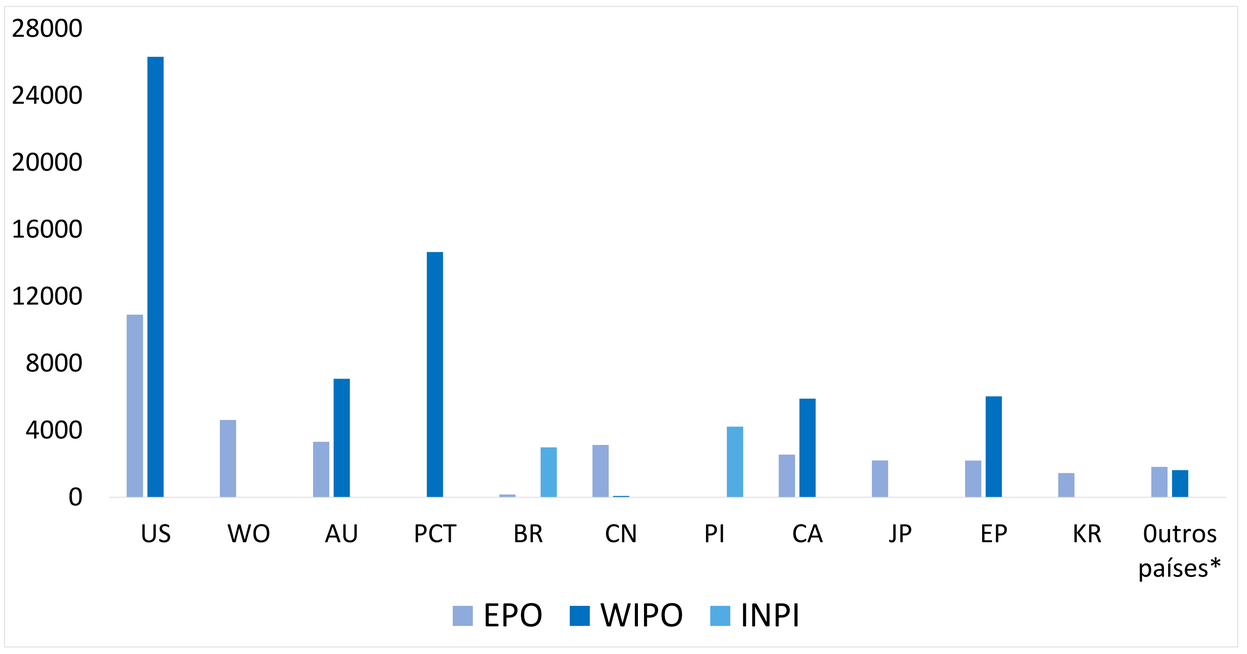
MATERIAL E MÉTODOS



RESULTADOS E DISCUSSÃO

- INPI: Busca básica (=680) e na avançada (=13.983);
- WIPO: Foi o banco com maior número de patentes depositadas (=287.521);
- EPO: Também mostrou uma grande representatividade (=88.023).

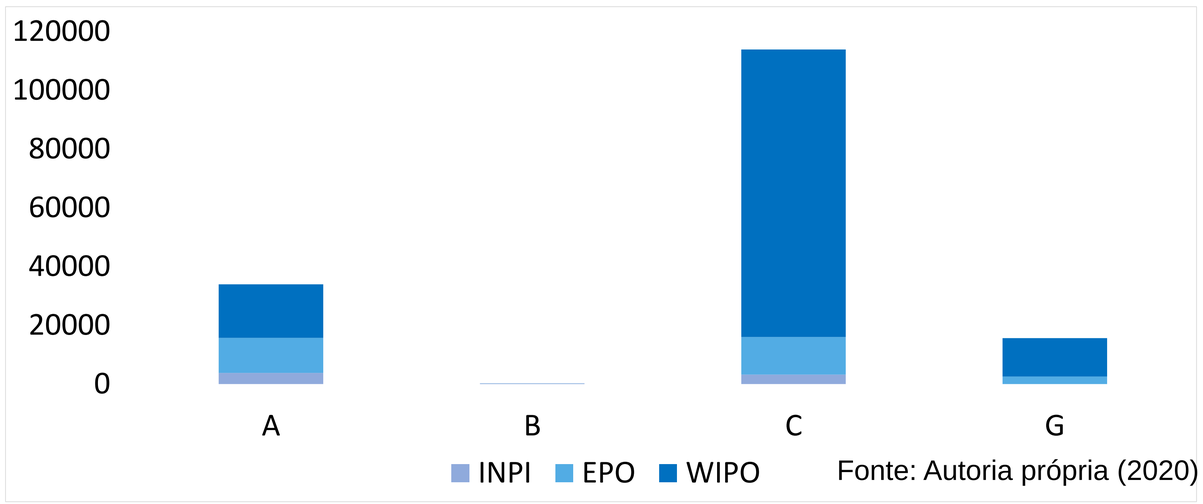
Gráfico 1 – Distribuição de Patentes por país



Fonte: Autoria própria (2020)

- INPI: Propriedade Intelectual (=4.220), Brasil (=2.985);
- WIPO: Estados Unidos(=26.323); PCT(=14.659);
- EPO: Estados Unidos (=10.913); Organização Mundial da Propriedade Intelectual (=4.621).

GRÁFICO 2- Seção das patentes



Fonte: Autoria própria (2020)

CONCLUSÃO

- Observa-se uma grande quantidade de pesquisas e patentes relacionadas a aplicações tanto industriais quanto terapêuticas de proteínas e vacinas produzidas em plantas transgênicas, porém poucas geram produtos para o mercado consumidor.
- Dessa forma, são necessários mais pesquisas e testes para que seja possível incorporar cada vez mais produtos recombinantes ao cotidiano.

REFERÊNCIAS

- TORRES et al. Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas.1998.
- SOARES-COSTA, Andrea; Schneider, V.K.; Nakayama, D.G.; Arencibia, A.D.; Henrique-Silva, F; "Plantas transgênicas: fundamentos, métodos de produção e aplicações", p. 649 -674. In: **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria** - Vol. 4. São Paulo: Blucher, 2017.

SIMULAÇÃO DA DIGESTÃO BIOLÓGICA *IN VITRO* DE FIBRAS DE AMIDO SOLÚVEL DE BATATA CARREGADAS COM EXTRATO DA CASCA DE PINHÃO

GABRIEL LUCAS PAIL[1]; ÉLDER PACHECO DA CRUZ[1]; LAURA MARTINS FONSECA[1]; MARJANA RADÜNZ[1]; ELESSANDRA DA ROSA ZAVAREZE[2]; CAROLINE DELLINGHAUSEN BORGES[2]

[1] Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal de Pelotas - gabriel.pail@hotmail.com; elder-pdc@hotmail.com; *laura_mfonseca@hotmail.com; marjanaradunz@gmail.com*

[2] Docente da Universidade Federal de Pelotas – elessandrad@yahoo.com.br; caroldellin@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A casca do pinhão (sementes de *Araucaria angustifolia*) apresenta uma quantidade de compostos fenólicos significativa (FONSECA et al., 2020). A maioria dos compostos fenólicos são instáveis e se degradam quando expostos a uma série de fatores (FANG; BHANDARI, 2010), como por exemplo, durante o processo de digestão, no qual, apenas os componentes não degradados são absorvidos pelo organismo, ou seja, o conteúdo desses compostos na matriz não reflete o conteúdo total disponível para metabolização (RUBIO et al., 2017).

A encapsulação de compostos fenólicos é uma alternativa para preservar e melhorar a sua biodisponibilidade. Logo, a técnica de *electrospinning* vem sendo muito utilizada, em razão, de ocorrer à temperatura ambiente, evitando a degradação dos compostos pela ação da temperatura (CHRANIOTI; CHANIOTI; TZIA, 2015). Nesse contexto, objetivou-se realizar a simulação da digestão biológica *in vitro* das fibras de amido solúvel de batata carregadas com extrato da casca de pinhão em diferentes concentrações, produzidas pela técnica de *electrospinning*.

2. METODOLOGIA

2.1 Material

O pinhão foi adquirido em agosto de 2018, de um produtor da cidade de Vacaria (Latitude: 28° 30' 39'' Sul, Longitude: 50° 55' 47'' Oeste), Rio Grande do Sul, Brasil. O extrato da casca de pinhão (ECP) liofilizado foi produzido de acordo com estudo anterior e apresentou 225,32 ± 0,89 $mg.g^{-1}$ de compostos fenólicos totais (FONSECA et al., 2020). Para a produção das fibras de amido foi utilizado amido solúvel de batata ($C_6H_{10}O_5$, Sigma-Aldrich, CAS 9005-25-8) com teor de amilose de 32,5 ± 3,6% e ácido fórmico (85% de pureza, Synth, CAS 01A1034.01).

2.2 Preparação das soluções poliméricas e produção das fibras pela técnica de *electrospinning*

Foram preparadas as soluções poliméricas formadoras de fibras utilizando 5 g de amido de batata solúvel de batata (50% p/v) em 10 mL de ácido fórmico 75% (in Milli-Q water, v/v). A solução foi agitada em agitador magnético por 24 h para dissolução total e para atingir a gelatinização do amido, após ficou em descanso por 24 h. O extrato da casca de pinhão (ECP) foi incorporado à solução nas concentrações de 0,5% e 1,5% (p/p) em base seca, e agitado em agitador magnético por 30 min para completa homogeneização. As soluções poliméricas foram utilizadas para produção de fibras de amido para encapsular o ECP pela técnica de *electrospinning*, de acordo com a metodologia descrita por Fonseca et al. (2020).

2.3 Simulação da digestão biológica simulada *in vitro*

2.3.1 Preparo da amostra

Para a determinação da simulação da digestão, as fibras de amido/ECP (500 mg) foram homogeneizadas em 2 mL de água ultra pura. Dessa solução foi retirada uma alíquota de 600 µL para ser utilizada como controle (fração não digerida, em meio aquoso). Após, foram realizadas simulações da digestão nas condições da boca, estômago e intestino, de acordo com o método proposto por Gião et al. (2012).

2.3.2 Simulação da digestão na boca

As amostras foram homogeneizadas com 600 µL de solução de α-amilase (100 $U.mL^{-1}$) de saliva humana tipo IX-A (Sigma-Aldrich, CAS 9000-90-2) e agitadas em banho-maria a 37 °C por 1 min. A solução foi utilizada para a continuação da simulação de digestão.

2.3.3 Simulação da digestão no estômago

A solução produzida pela simulação da digestão na boca teve seu pH ajustado para 2,0 usando HCl (1 $mol.L^{-1}$). Após foram adicionados 750 µL de uma solução de pepsina (Sigma-Aldrich, CAS 9001-75-6) (25 $mg.mL^{-1}$ preparada com HCl 0,1 $mol.L^{-1}$) e em seguida agitou-se em banho-maria a 37 °C por 60 min. A solução foi utilizada para a continuação da simulação de digestão.

2.3.4 Simulação da digestão no intestino

O pH da solução produzida pela simulação da digestão no estômago foi ajustado para 6 com $NaHCO_3$ (1 $mol.L^{-1}$) e adicionou-se a 375 µL de solução de pancreatina (2 $g.L^{-1}$ em 1 M $NaHCO_3$; Sigma Aldrich, CAS 8049-47-6) e sais biliares (12 $g.L^{-1}$ em 1 M $NaHCO_3$; Sigma Aldrich), em seguida agitou-se em banho a 37 °C por 60 min.

2.3.5 Avaliação da digestão biológica

Após a coleta das amostras em todos os estágios (alíquotas de 600 µL), as amostras foram avaliadas por espectrofotometria (SpectraMax 190, leitor de microplacas, Molecular Devices, EUA) a 725 nm, quanto ao teor de compostos fenólicos totais. A quantificação dos compostos fenólicos totais das fibras foi realizada pelo método de Swain e Hillis (1959), com modificações. A quantificação foi realizada utilizando a curva de calibração preparada com o ácido gálico, nas

concentrações de 25 a 450 mg.mL^{-1} (y= 0,0026x - 0,0064 , R^2= 0,9968). O conteúdo de compostos fenólicos foi expresso em equivalentes de ácido gálico (mg EAG.g^{-1}).

2.4 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey ao nível de significância estatística de p ≤ 0,05.

3. RESULTADOS

Na Figura 1 está apresentada a simulação da digestão biológica das fibras de amido carregadas com 0,5 e 1,5% de extrato da casca de pinhão (ECP).

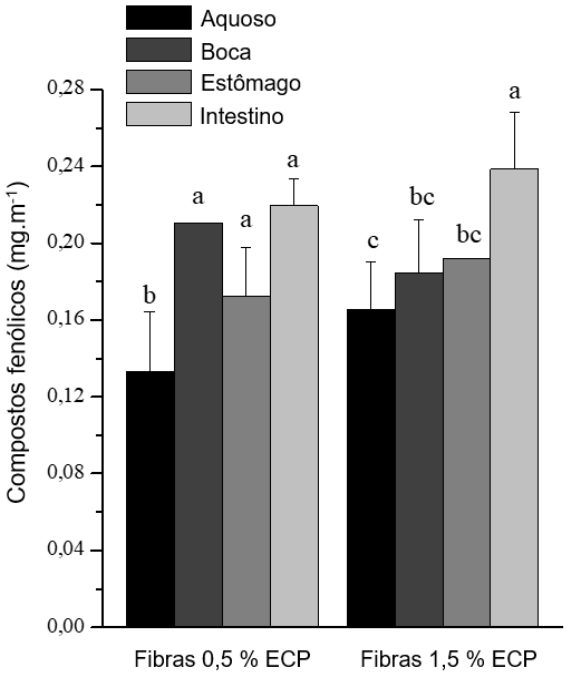


Figura 1. Simulação da digestibilidade biológica das fibras de amido contendo ECP. [a,b,c] Valores com diferentes letras para a mesma amostra nos diferentes tratamentos apresentam diferença significativa (p ≤ 0,05).

Com relação à simulação da digestão *in vitro* das fibras com 0,5% ECP, houve significativamente (p ≤ 0,05) menor liberação dos compostos fenólicos em meio aquoso em relação às condições de digestibilidade na boca, estômago e intestino. Na digestão das fibras ultrafinas com 1,5% ECP, não houve diferença significativa (p ≥ 0,05) no teor de compostos fenólicos no meio aquoso e nas condições de simulação da digestão na boca e no estômago. Entretanto, houve aumento significativo (p ≤ 0,05) na liberação dos compostos fenólicos nas condições intestinais.

A não liberação, ou baixa liberação dos compostos fenólicos no meio aquoso, com o intuito de simular um alimento, é considerado um comportamento ideal. Por

outro lado, espera-se que ocorra baixa liberação dos compostos na boca e no estômago e maior liberação nas condições intestinais, pois a absorção dos compostos ocorre no jejuno e íleo, de onde são enviados pela corrente sanguínea até o fígado, metabolizadas e distribuídas aos órgãos para desempenharem seus efeitos biológicos (JIA et al., 2016). Assim, as fibras de amido com 1,5% de ECP apresentaram o melhor comportamento em relação à liberação dos compostos fenólicos durante a digestão, sendo liberados de forma controlada e específica no local adequado.

4. CONCLUSÃO

A encapsulação do extrato da casca de pinhão em fibras de amido solúvel de batata pela técnica de *electrospinning* foi capaz de proteger os compostos fenólicos, sendo que as fibras com 1,5% ECP apresentaram um comportamento ideal, visando a liberação ao final do processo digestivo para absorção no organismo.

5. REFERÊNCIAS

CHRANIOTI, C.; CHANIOTI, S.; TZIA, C. Microencapsulation of steviol glycosides (*Stevia rebaudiana* Bertoni) by a spray drying method – Evaluation of encapsulated products and prepared syrups. **International Journal of Food Studies,** v.4, p.212-220, 2015.

FANG, Z; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols – A review. **Trends in Food Science and Technology.** v.21, p.510-523, 2010.

FONSECA, L.M.; OLIVEIRA, J.P.; CRIZEL, R.L.; SILVA, T.F.; ZAVAREZE, E.R.; BORGES, C.D. Electrospun starch fibers loaded with pinhão (*Araucaria angustifolia*) coat extract rich in phenolic compounds. **Food Biophysics**. 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11483-020-09629-9>. Acesso em julho de 2020.

GIÃO, M.S.; GOMES, S.; MADUREIRA, A.R.; FARIA, A.; PESTANA, D.; CALHAU, C.; PINTADO, M.E.; AZEVEDO, I.; MALCATA, F.X. Effect of *in vitro* digestion upon the antioxidant capacity of aqueous extracts of *Agrimonia eupatoria*, *Rubus idaeus*, *Salvia* sp. and *Satureja montana*. **Food Chemistry**. v.131, p.761-767, 2012.

JIA, Z.; DUMONT, M-J.; ORSAT, V. Encapsulation of phenolic compounds presentin plants using protein matrices. **Food Bioscience**, v. 15, p. 87–104, 2016.

RUBIO, F. T. V. **Biossorção de compostos fenólicos de bagaços de uva em *Saccharomyces cerevisiae*: mecanismos do processo e bioacessibilidade**. 2017. 89 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2017.

SWAIN, B. T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.10, p.63-68, 1959.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

SIMULAÇÃO DA DIGESTÃO BIOLOGICA *IN VITRO* DE FIBRAS DE AMIDO SOLÚVEL DE BATATA CARREGADAS COM EXTRATO DA CASCA DE PINHÃO

GABRIEL LUCAS PAIL[1]; ÉLDER PACHECO DA CRUZ[1]; LAURA MARTINS FONSECA [1]; MARJANA RADÜNZ [1]; ELESSANDRA DA ROSA ZAVAREZE [2]; CAROLINE DELLINGHAUSEN BORGES [2].

Agradecimentos



Pinhão (*Araucaria angustifolia*)



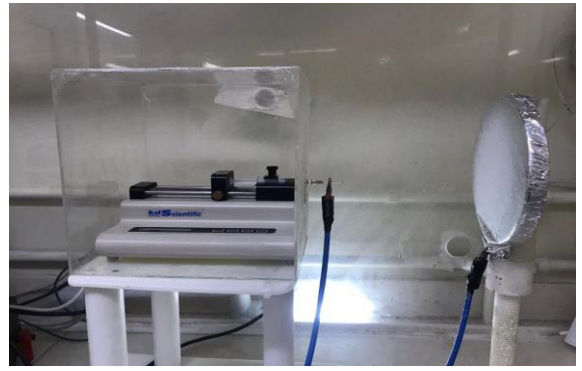
Extrato da casca do pinhão (ECP)



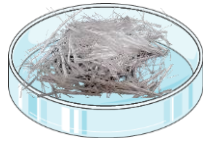
Amido de batata (50%) e Acido fórmico (75%)



Soluções poliméricas



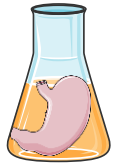
Técnica de *Electrospinning*



Fibras Carregadas com ECP



Digestão na Boca



Digestão no Estomago



Digestão no Intestino



Meio aquoso



Espectrofotômetro

CARACTERIZAÇÃO DE *Fa*TCPs EM *Fragaria x ananassa*

GUSTAVO HENRIQUE CAMOZATTO[1]; ROSANE LOPES CRIZEL[2]; AUDREY CRISTINA DO NASCIMENTO[3]; VANESSA GALLI[4]

Universidade Federal de Pelotas – gustavocamozatto@gmail.com
Universidade Federal de Pelotas – rosanecrizel1@hotmail.com
Universidade Federal de Pelotas – audreycn97@gmail.com
Universidade Federal de Pelotas – vane.galli@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o cultivo do morangueiro vem se tornando cada vez mais comum devido à sua alta rentabilidade para o produtor rural. Entre os anos de 2006 e 2016 houve um aumento expressivo na produção de morango no país, passando de 5,8 para 9 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2018) evidenciando uma alta demanda pelo fruto. Apesar de um notável crescimento na produção, a cultura enfrenta alguns desafios como a alta perecibilidade pós colheita em razão de sua baixa resistência mecânica e susceptibilidade a infecções fúngicas.

A maturação do morango é caracterizada por uma série de mudanças fisiológicas, como degradação da clorofila e parede celular, aumento no teor de antocianinas e acúmulo de sacarose (Jia et al. 2011). Essas mudanças ocorrem ao longo do amadurecimento do fruto e são coordenadas por diferentes proteínas que se ligam a sequências específicas de DNA. Essas proteínas são conhecidas como fatores de transcrição e atuam unindo a enzima RNA polimerase ao DNA, bloqueando ou ativando a expressão de genes das rotas metabólicas relacionadas ao crescimento e desenvolvimento do receptáculo floral. As TCPs (teosinte branched 1, cycloidea e PCF) são uma família de fatores de transcrição caracterizada pela presença de uma região conservada bHLH (basic helix-loop-helix) responsável por ligar a proteína ao segmento de DNA, e domínios proteicos como tiolose, 2Fe-2S ferredoxin, EGF (epidermal growth factor) e VWFC (Fator Von Willebrand de tipo C).

Pesquisas em diferentes espécies vegetais como *Oryza sativa, Zea mays, Fragaria vesca, Malus domestica*, são realizadas afim de elucidar a função das diferentes isoformas dessa família de fatores de transcrição. Em *Gossypium barbadensis* por exemplo, membros dessa família estão relacionados a elongação da fibra e desenvolvimento de pelos radiculares (Hao et al. 2012) e em *Arabidopsis thaliana* a *At*TCP3 forma complexos proteicos com a R2R3-MYB e promove a síntese de flavonoides (Li et al. 2013), um importante grupo de metabólitos secundários, do qual fazem parte as antocianinas, pigmentos solúveis presentes no morango, responsáveis por sua coloração avermelhada nos estádios finais de amadurecimento (Silva et al. 2005).

Para entender o complexo processo de maturação dos frutos não climatéricos como o morango, é importante entender os mecanismos genéticos por trás do desenvolvimento e senescência deste pseudofruto, tornando possível abordagens biotecnológicas que visem diminuir perdas na produção ou mesmo aumentar o teor de compostos benéficos para a saúde humana. Dessa forma, o presente estudo busca caracterizar os membros da família de fatores de

transcrição TCP em *Fragaria x ananassa*, para que em trabalhos futuros sua atuação nesse organismo vegetal seja melhor elucidada.

2. METODOLOGIA

As sequências gênicas correspondentes às diferentes isoformas de *Fa*TCP foram baixadas do banco de dados de fatores de transcrição vegetais Plant TFDB (http://planttfdb.gao-lab.org/) e reunidas em um arquivo FASTA para realizar as análises posteriores.

Para obter o ponto isoelétrico e peso molecular foi utilizado a ferramenta Compute pI/Mw da plataforma ExPASy (https://web.expasy.org/compute_pi/). Outra análise realizada foi a de localização subcelular, na qual as sequências de aminoácido foram submetidas ao DeepLoc, um preditor de localização para eucariotos (http://www.cbs.dtu.dk/services/DeepLoc/). Enquanto a predição de domínios foi obtida na ferramenta PROSITE (https://prosite.expasy.org/cgi-bin/prosite/nicedoc.pl?PS51369).

Além disso, foi efetuado uma busca por motivos proteicos através do programa MEME, Multiple EM for Motif Elicitation (http://meme-suite.org/tools/meme), enquanto a busca por domínios foi realizada por meio do PROSITE (https://prosite.expasy.org/).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foi realizado uma busca de *Fa*TCPs em morango (*Fragaria x ananassa*) e quinze putativas sequências foram obtidas a partir do banco de dados de fatores de transcrição Plant TFDB. Para verificar a confiabilidade dessas sequências, verificou-se a presença de domínios típicos de TCP utilizando a ferramenta PROSITE. Todas as sequências correspondiam a proteínas, sendo *Fa*TCP12 (57534,4 Da) a com maior peso molecular e *Fa*TCP13 (10699,9) a com menor peso molecular, enquanto o ponto isoelétrico variou de 4,7918 (*Fa*TCP3) a 11,2265 (*Fa*TCP2) (Tabela 1). Os 15 genes preditos para codificar as isoformas da família das *Fa*TCP possuem localização nuclear (Tabela 1) indicando um padrão típico de fatores de transcrição, uma vez que os mesmos regulam a transcrição de genes alvo atavés da ligação a cis elementos específicos em seus promotores e essa ligação, por sua vez, ocorre no núcleo. No entanto, a *Fa*TCP3 apresenta, também, localização citoplasmática; esse mesmo gene foi relacionado a biossíntese de flavonóides (MIAO, 2016).

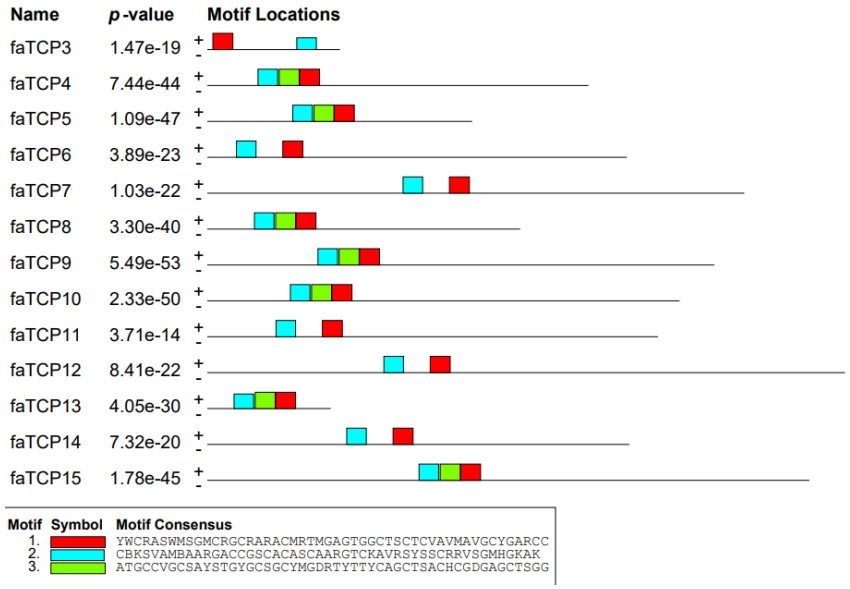
Tabela 1. Características das isoformas da família *Fa*TCP.

No.	Gene	CDS (nt)	Mw	pI	Aa	Localização Celular
1	*Fa*TCP1	289	10882,1 Da	10,7452	96	Núcleo 0,9666
2	*Fa*TCP2	361	13124,8 Da	11,2265	120	Núcleo 0,9971
3	*Fa*TCP3	332	11796,1 Da	4,7918	109	Núcleo 0,5391

						Citoplasma 0,4063
4	*Fa*TCP4	954	33037,2 Da	7,9127	317	Núcleo 0,9962
5	*Fa*TCP5	663	24092,6 Da	8,4067	220	Núcleo 0,9898
6	*Fa*TCP6	1050	39411,3 Da	10,7765	349	Núcleo 0,9386
7	*Fa*TCP7	1344	50327,7 Da	6,8793	447	Núcleo 0,9996
8	*Fa*TCP8	783	28026,9 Da	9,0438	260	Núcleo 0,9993
9	*Fa*TCP9	1269	45235,5 Da	7,2598	422	Núcleo 0,921
10	*Fa*TCP10	1182	41701,8 Da	7,952	393	Núcleo 0,8603
11	*Fa*TCP11	1128	41477,2 Da	9,0286	375	Núcleo 0,8987
12	*Fa*TCP12	1596	57534,4 Da	10,1545	531	Núcleo 0,8534
13	*Fa*TCP13	309	10699,9 Da	7,4205	103	Núcleo 0,8815
14	*Fa*TCP14	1056	39151,1 Da	8,9351	351	Núcleo 0,9993
15	*Fa*TCP15	1507	53108,7 da	8,3545	501	Núcleo 0,9971

Quanto a presença de motivos proteicos, em *Fragaria x vesca* existem quatro motivos conservados que podem estar presentes nas isoformas da família das TCPs, são eles o motivo 1 que se localiza no domínio TCP; o motivo 2 localizado na região N-terminal; o motivo 3 localizado na região C-terminal e o motivo 4 chamado de R. (WEI, 2016). No entanto, em nosso estudo com *Fragaria x ananassa* identificamos em sete isoformas a existência de apenas três motivos presentes em seu ancestral diplóide (*Fa*TCP4, *Fa*TCP5, *Fa*TCP8, *Fa*TCP9, *Fa*TCP10, *Fa*TCP13 e *Fa*TCP15), enquanto seis isoformas apresentam apenas dois motivos característicos (*Fa*TCP3, *Fa*TCP6, *Fa*TCP7, *Fa*TCP11, *Fa*TCP12 e *Fa*TCP14), o que sugere eventos de deleção nessas sequências a partir da sequência ancestral.

Figura 1. Motivos proteicos presentes em *Fa*TCP.



4. CONCLUSÕES

Em *Fragaria x vesca* estudos de caracterização da família gênica das TCPs são comuns, entretanto em *Fragaria x ananassa* (morango comercial) ainda não há estudos desse tipo. Esse trabalho possibilitou a identificação de 15 sequências de *Fa*TCP e sua caracterização quanto ao peso molecular, ponto isoelétrico, quantidade de aminoácidos e sua possível localização celular, bem como traçar um paralelo entre a presença de motivos proteicos nessa espécie octaplóide em comparação com a espécie ancestral *Fragaria x vesca* diplóide. Estudos futuros como análise filogenética, interatoma e quantificação da expressão gênica serão realizados afim de elucidar as funções dessa família de fatores de transcrição no contexto da maturação e eventos estressores.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

da Silva, F. L., Escribano-Bailón, M. T., Pérez Alonso, J. J., Rivas-Gonzalo, J. C., & Santos-Buelga, C. (2007). Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT - Food Science and Technology*, *40*(2), 374–382.

FAOSTAT, Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura. Dado de Cultivos. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC

Jia, A. H., Chai, Y., Li, C., Lu, D., Luo, J., Qin, L., … September, N. (2014). Abscisic Acid Plays an Important Role in the Regulation of Strawberry Fruit Ripening Yuan-Yue Shen Stable *157*(1), 188–199.

Li, S., & Zachgo, S. (2013). TCP3 interacts with R2R3-MYB proteins, promotes flavonoid biosynthesis and negatively regulates the auxin response in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal*, *76*(6), 901–913.

Hao, J., Tu, L., Hu, H.,Tan, J., Deng, F., Tang, W., Nie, Y., Zhang, X. (2012). GbTCP, a cotton TCP transcription fator, confers fibre elongation and root hair development by a complex regulating system. Journal of Experimental Botany, Vol. 63, No. 17, pp. 6267-6281.

Miao, L., Zhang, Y., Yang, X., Xiao, J., Zhang, H., Zhang, Z., … Jiang, G. (2016). *Colored light-quality selective plastic films affect anthocyanin content, enzyme activities, and the expression of flavonoid genes in strawberry (Fragaria×ananassa) fruit. Food Chemistry, 207, 93–100.*

Wei, W., Hu, Y., Cui, M.-Y., Han, Y.-T., Gao, K., & Feng, J.-Y. (2016). *Identification and Transcript Analysis of the TCP Transcription Factors in the Diploid Woodland Strawberry Fragaria vesca. Frontiers in Plant Science, 07*

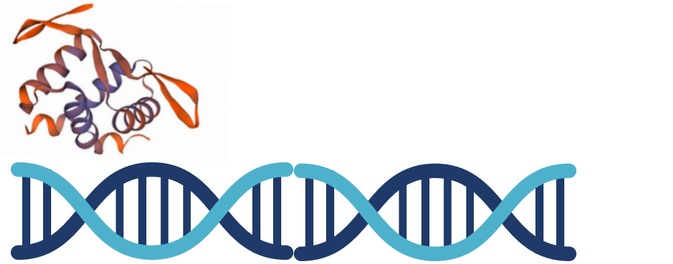
VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde Única
IV MOSTRA ACADÊMICA

CARACTERIZAÇÃO DE FaTCPs EM Fragaria x ananassa

GUSTAVO HENRIQUE CAMOZATTO1; ROSANE LOPES CRIZEL2; AUDREY CRISTINA DO NASCIMENTO3; VANESSA GALLI4

TCP's

Família de fatores de transcrição presente em Fragaria x ananassa.





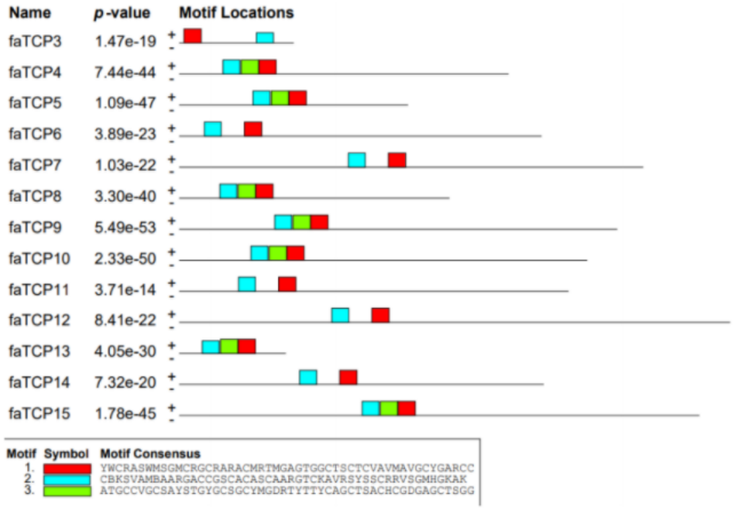


Análises de Bioinformática:

- **TFDB;**
- **ExPASy;**
- **PROSITE;**
- **MEME**
- **DeepLoc**



Motivos proteicos presentes em *Fa*TCP.



OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO DE UMA ENZIMA FIBRINOLÍTICA OBTIDA DE UMA LEGUMINOSA ATRAVÉS DO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS

MILENA TEREZA TORRES DO COUTO[1]; ANÍBIA VICENTE DA SILVA[2]; MÁRCIA NIEVES CARNEIRO DA CUNHA[3]; ANA CRISTINA LIMA LEITE[4], THIAGO PAJEÚ NASCIMENTO[5], ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO[6]

[1]*Universidade Federal de Pernambuco – torresc.milena@gmail.com*
[2]*Universidade Federal Rural de Pernambuco – anibia_v@yahoo.com.br*
[3]*Universidade Federal Rural de Pernambuco – marcianieves@yahoo.com.br*
[4]*Universidade Federal de Pernambuco – acllb2003@yahoo.com.br*
[5]*Universidade Federal Rural de Pernambuco – thiago_pajeu@hotmail.com*
[6]*Universidade Federal Rural de Pernambuco – analuporto@yahoo.com.br*

1. INTRODUÇÃO

Proteases são enzimas de relevância industrial crescente em virtude da sua facilidade de obtenção e alteração, baixas necessidades nutricionais, baixo custo de produção e rapidez de síntese. Entre algumas aplicações dessas proteases está a capacidade de prevenir ou curar doenças trombóticas pela degradação de coágulos sanguíneos, mantendo o fluxo sanguíneo em sítios de lesão vascular. A farmacoterapia atual apesar do uso generalizado, exibe baixa especificidade, alto custo e riscos como sangramento gastrointestinal, reações alérgicas, hipertensão e hipotensão arterial, por isso são necessários a descoberta e desenvolvimento de novas opções terapêuticas (ADRIO; DEMAIN, 2014; NASCIMENTO, *et al*., 2017).

Essas enzimas podem ser extraídas de diversas fontes, entretanto há poucos dados publicados sobre proteases fibrinolíticas oriundas de plantas. A *Gliricidia sepium* é uma leguminosa bastante rica em proteína bruta e possui proteases com diversas atividades farmacológicas já descritas na literatura: atividade larvicida, antimicrobiana, antibacteriana, anti-inflamatória, dentre outras. O sistema de duas fases aquosas (SDFA) é um método para separação de biomoléculas de produtos de origem biológica que é eficiente para extração de proteínas, enzimas e ácidos nucleicos. Sendo biodegradável, atóxico e adequado para produção em larga escala, possuindo baixo custo, propriedades físicas e químicas favoráveis, além de não permitir a diminuição da atividade das biomoléculas extraídas (IQBAL *et al*., 2016).

Esse estudo tem como objetivo extrair uma protease fibrinolítica obtida do endosperma de sementes de *Gliricidia sepium* através de um planejamento fatorial 2^4 utilizando o Sistema de Duas Fases Aquosas (Polietilenoglicol/ Fosfato de sódio) e analisar a influência das suas variáveis resposta sobre a partição dessa enzima.

2. METODOLOGIA

O endosperma da semente de *Gliricidia sepium* (ADD4CA4 - SISGEN) foi separado e moído em pó fino, cujo extrato foi obtido a 100 rpm por 4 horas à

25°C em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 6. Utilizou-se um planejamento fatorial 2^4 para avaliar a purificação do extrato bruto por um SDFA (PEG/Fosfato) onde foi estudada a influência das variáveis (concentração do PEG e sal, massa molar do PEG e pH) obtendo como variável resposta o coeficiente de partição (*K*), fator de purificação (*FP*) e recuperação (*Y*). Para a determinação da atividade fibrinolítica foi utilizado o método espectrofotométrico (WANG *et al*., 2011). Determinou-se a dosagem de proteína pela metodologia de (BRADFORD, 1979). As análises estatísticas foram feitas utilizando o Software *Statistica* 8.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o extrato bruto do endosperma ser submetido ao SDFA para a extração da protease fibrinolítica, a melhor condição dentre os 20 ensaios realizados através do planejamento fatorial 2^4 foi formada por 17,5% (m/m) de PEG 1500g/mol, 15% (m/m) de fosfato de sódio e pH 6 que assegurou a partição da enzima preferencialmente para a fase rica em PEG (*K*=1,54). Nesse ensaio foi obtido um *FP* de 8,30, *Y* de 99,19% e uma atividade fibrinolítica específica de 16,02U/mg, bem acima da atividade da enzima presente no extrato bruto (1,93U/mg).

Apenas três ensaios particionaram a enzima para fase rica em PEG, tendo os valores de *K* geral variando de 0,51 a 1,54. Entre as variáveis que mais influenciaram na purificação da enzima, a concentração de Fosfato foi a mais estatisticamente significativa tendo um efeito positivo e em segundo o pH que diferentemente teve um efeito negativo, ou seja, quanto menor o pH maior a purificação da protease fibrinolítica obtida na fase PEG.

Em SDFA a presença de fosfato influencia o *K* das biomoléculas agindo sobre a carga das proteínas. Os sais de fosfato elevam o *K* de proteínas em relação a outros sais, além de ser uma boa alternativa de baixo custo aos processos convencionais (SILVA *et al*., 2020). A partição da protease fibrinolítica para a fase rica em PEG explica-se pelo efeito *salting out* em que a biomolécula é direcionada para outra fase como consequência da grande quantidade de sal na fase inferior, pois as moléculas de água ocupadas em sua interação com os íons deixam a estrutura proteica, e como consequência temos maior interação proteína-proteína e diminuição da solubilidade em meio aquoso (PLATIS; LABROU, 2006). A protease fibrinolítica de *Petasites japonicus* obtida em cinco etapas alcançou um *Y* de 17,2% (KIM *et al*., 2015) bem abaixo ao encontrado nos nossos experimentos (99,19%).

4. CONCLUSÕES

Uma protease fibrinolítica originada do endosperma de sementes da leguminosa *Gliricidia sepium* foi extraída por sistema de duas fases aquosas (PEG/Fosfato), sendo as variáveis resposta de extração investigadas. A enzima teve a capacidade de degradar o coágulo de fibrina diretamente, dessa forma este trabalho demonstra o potencial do SDFA como uma metodologia de extração primária eficaz na recuperação e pré purificação da protease fibrinolítica permitindo futuramente explorar o potencial farmacológico dessa enzima, candidata promissora na terapia trombolítica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Anal. Biochem**, v. 72, p. 248–254, 1976.

IQBAL, M.; TAO, Y.; XIE, S. *et al.* Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. **Biological procedures online**, v. 18, n. 18, 2016.

KIM, D.W. *et al*. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from *Petasites japonicus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 1159-1167, 2015.

NASCIMENTO, T.P.; SALES, A.E.; PORTO, T.S. *et al*. Purification, biochemical, and structural characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Mucor subtilissimus* UCP 1262. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, p. 1209–1219, 2017.

PLATIS, D.; LABROU, N.E. Development of an aqueous two-phase partitioning system for fractionating therapeutic proteins from tobacco extract, **Journal of Chromatography A**, v. 1128, p. 114-124, 2006.

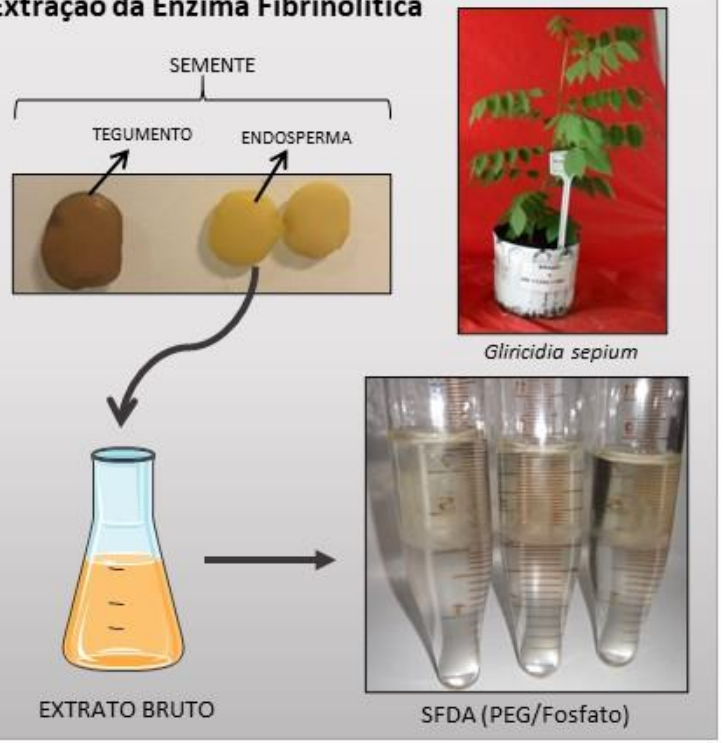
SILVA, A.V. *et al*. Partial purification of fibrinolytic and fibrinogenolytic protease from *Gliricidia sepium* seeds by aqueous two-phase system. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 101669, 2020.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

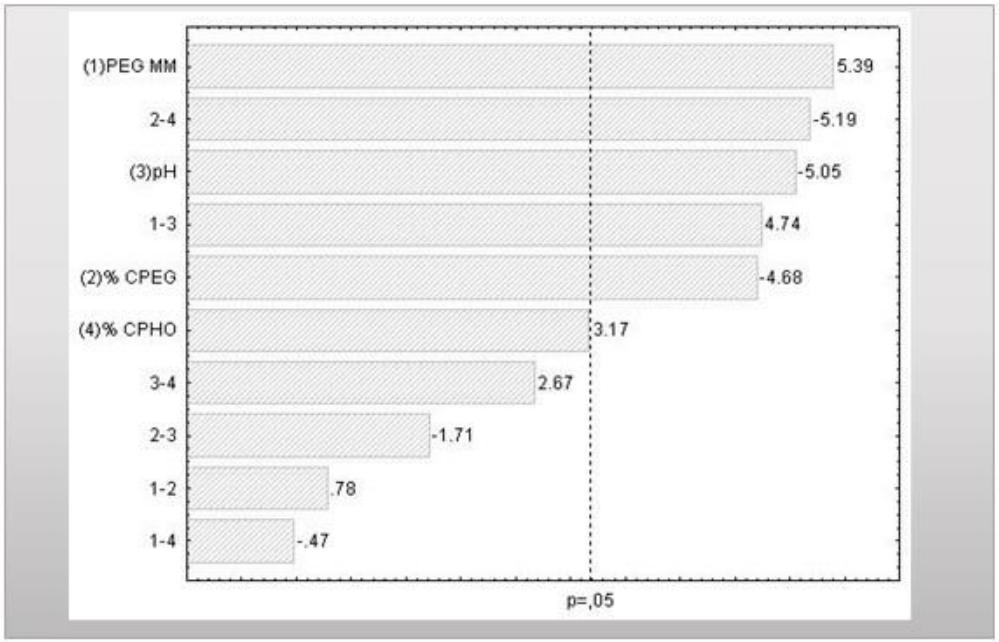
OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO DE UMA ENZIMA FIBRINOLÍTICA OBTIDA DE UMA LEGUMINOSA ATRAVÉS DO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS

MILENA COUTO[1]; ANÍBIA DA SILVA[2]; MÁRCIA CUNHA[3]; ANA LEITE[4]; THIAGO NASCIMENTO[5]; ANA PORTO[6]

Extração da Enzima Fibrinolítica



Efeitos e interações das variáveis independentes sobre o coeficiente de partição da enzima fibrinolítica de sementes de *Gliricidia sepium*



PRODUÇÃO DE MEMBRANA BARREIRA PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA COM ZEÍNA

CRISTIANE MICHELE ALVES DE OLIVEIRA[1]; ORIENTADORA: ELIANE TROVATTI[2]

[1]UNIARA – Universidade de Araraquara 1 – cristiane.michele87@gmail.com 1
[2] UNIARA – Universidade de Araraquara 2– elianetrov@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O objetivo deste projeto foi em desenvolver uma membrana de barreira para enxertos ósseos dentários a partir da zeína, e avaliar sua citotoxicidade, reabsorção in vitro, propriedades mecânicas e de barreira celular.

Uma membrana com proteína de origem vegetal conhecida por zeína, com possibilidades biodegradáveis para regeneração óssea guiada (RGO), foi desenvolvida sendo suas particularidades discutidas ao longo do trabalho. Para melhor entendimento a respeito do tema serão discutidos alguns conceitos e definições acerca da proteína e RGO.

Proteínas derivadas de plantas são de grande interesse por serem renováveis e biodegradáveis, pois oferecem benefícios ambientais sobre os materiais à base de petróleo (BISHARAT et al., 2017).

O uso da zeína para a indústria ainda é pouco conhecida, esta proteína encontra-se no endosperma do milho, com alto teor de aminoácidos apolares, permitindo assim uma estrutura molecular hidrofóbica, solubilizando-se em álcool, possibilitando sua extração (SHUKLA & CHERYAN, 2001 apud PAPALIA; LONDERO, 2015).

2. METODOLOGIA

Várias técnicas para a extração da zeína foram e estão sendo utilizadas ao longo dos anos. Essa extração pode acontecer por métodos químicos ou enzimáticos. Certos fatores como o tipo de solvente, temperatura, pH e tempo de extração contribuem para eficiência do processo (SHUKLA; CHERYAN, 2001; CAPOBIANGO et al., 2006 apud PAPALIA; LONDERO, 2015).

No presente estudo a extração química da proteína foi realizada na Escola Técnica Coronel Raphael Brandão/Barretos, no laboratório de química.

A proteína foi extraída/purificada e confeccionada em membranas de barreiras, as quais foram caracterizadas quanto às suas propriedades morfológicas, mecânicas, de biodegradação, quanto à sua capacidade de barreira contra invasão celular e ensaios de citotoxicidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A zeína foi extraída utilizando-se uma metodologia simples de extração com solvente isopropílico sob aquecimento e agitação. A etapas da extração estão ilustradas na figura 13, onde o milho seco foi triturado até atingir a granulometria de pó, seguindo-se assim o processo de extração já citado na metodologia deste trabalho. Após o processo de extração, o solvente foi separado da matéria-prima por filtração, conforme ilustrado. A solução resultante contendo a zeína foi seca à temperatura ambiente e lavado com hexano por 3 vezes para a remoção do excesso de gorduras. Este material foi dissolvido em etanol (figura 14) e seco em estufa a 45ºC, e então prensado a 70ºC, gerando os filmes utilizados neste trabalho.

4. CONCLUSÕES

A extração da proteína foi realizada com sucesso, sendo o seu rendimento satisfatório para a utilização em todos os ensaios presentes neste trabalho.

A caracterização por FTIR indicou que o produto resultante do processo de extração é a proteína de interesse.

Após a confecção da membrana e sua submissão e os resultados ensaio de degradação hidrolítica em vitro, houve a necessidade de sua reticulação para a continuação deste trabalho.

As propriedades mecânicas revelam que a amostra reticulada apresenta maior resistência a deformação após uma tensão em comparação com a amostra não reticulada.

Os ensaios de citotoxicidade e migração/invasão celular, ambos foram de maneira geral eficazes na avaliação de citotoxicidade e barreira celular.

A proteína reticulada apresentou propriedades superiores à não reticulada para a aplicação proposta neste trabalho.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDERSON, Timothy J.; LAMSAL, Buddhi P. **Zein extraction from corn, corn products, and coproducts and modifications for various applications: a review**. Cereal Chemistry, v. 88, n. 2, p. 159-173, 2011. Disponível em: ‹https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1094/CCHEM-06-10-0091›. Acesso em: 12 de jul. de 2019.

2. AYUB, Lauro Garrastazu et al. **Regeneração óssea guiada e suas aplicações terapêuticas**. Braz J Periodontol, v. 21, n. 4, 2011. Disponível em: ‹https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/44627784/artigo4.pdf?response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DRegeneracao_ossea_guiada_e_suas_aplicaco

.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-Credential=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A%2F20190712%2Fus-east-1%2Fs3%2Faws4_request&X-Amz-Date=20190712T224826Z&X-Amz-Expires=3600&X-Amz-SignedHeaders=host&X-Amz Signature=3ed464dca50aa5e128de096b18d5526a21f209072f989425f4091447b356a29d›. Acesso em: 12 de jul. de 2019.

3. BANCILA, Sabina et al. **Ultrasoundassisted zein extraction and determination in some patented maize flours**. Rev. Roum. Chim, v. 61, n. 10, p. 725-731, 2016. Disponível em: ‹https://www.researchgate.net/profile/Gabi_Drochioiu/publication/308892351_Ultrasound-assisted_zein_extraction_and_determination_in_some_patented_maize_flours/links/57f5516508ae280dd0b8dec7.pdf›. Acesso em: 15 de jul. 2019.

4. BAYNE, Stephen C. Dental biomaterials: **where are we and where are we going?**. **Journal of dental education**, v. 69, n. 5, p. 571-585, 2005. Disponível em: ‹http://www.jdentaled.org/content/jde/69/5/571.full.pdf›. Acesso em: 12 de jul. de 2019.

5. Bhat, Sumrita and Ashok Kumar. “**Biomaterials in Regenerative Medicine**”. (2012). Disponível em: ‹https://pdfs.semanticscholar.org/4a17/0a97a993d5f64d7cf00f36611d8b065a787d.pdf?_ga=2.162973564.1160422109.1562974140-852678246.1562974140›. Acesso em: 12 de jul. de 2019.

6. BISHARAT, Lorina et al. **Aggregation of zein in aqueous ethanol dispersions: Effect on cast film properties**. International journal of biological macromolecules, v. 106, p. 360-368, 2018. Disponível em: ‹https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813017307791?via%3Dihub›. Acesso em: 12 de jul. de 2019.

7. COSTA, J. B. Z. et al. O uso de membranas biológicas para regeneração óssea guiada em implantodontia. **Revista Bahiana de odontologia**, v. 7, n. 1, p. 14-21, 2016. Disponível em: ‹ file:///H:/Users/Jorge%20Bonadio/Documents/Downloads/751-3410-1-PB%20(4).pdf›. Acesso em: 11 de agosto de 2019.

8. DA SILVA PAPALIA, Índira; LONDERO, Patrícia Medianeira Grigoletto. **Extração de zeína e sua aplicação na conservação dos alimentos**. Ciência Rural, v. 45, n. 3, p. 552-559, 2015. Disponível em: ‹https://www.redalyc.org/pdf/331/33138344028.pdf›. Acesso em 12 de jul. de 2019.

9. Dabra, S., Chhina, K., Soni, N., & Bhatnagar, R. (2012). **Engenharia de tecidos na regeneração periodontal**: uma breve revisão. *Dental research jornal*, *9* (6), 671–680. Disponível em: ‹https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3612212/›. Acesso em: 12 de jul. de 2019.

10. MOREIRA, Maria Teresa de Oliveira. **Biologia da regeneração periodontal**. 2017. Tese de Doutorado. Disponível em: ‹http://hdl.handle.net/10400.26/18915›. Acesso em: 12 de jul. de 2019.

11. O’BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue

(resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammaliam cell cytotoxicity. European Journal of Biochemistry, v. 267 (17), p. 5421-5426, 2000. Disponível em: ‹ https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x›. Acesso em: 03 de janeiro de 2020.

12. PAES, Maria Cristina Dias. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. **Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2006. Disponível em: ‹ https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/489376/1/Circ75.pdf›. Acesso em: 15 de agosto de 2019.

13. PEREIRA, Nayla Silva et al. Regeneração óssea guiada utilizando membrana reabsorvível fixada com etilcianoacrilato. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 69, n. 1, p. 39, 2012. Disponível em: ‹ http://www.revista.aborj.org.br/index.php/rbo/article/view/367/299›. Acesso em: 29 de agosto de 2019.

14. RIBEIRO, Wanessa Ximenes. **Caracterizaçãode biofilme àbase de zeína e ácido oléico adicionado de nanocarbonato**. 2014. 55 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2014. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/115792>. Acesso em: 14 de jul. 2019.

15. SALOMÃO, Munir; SIQUEIRA, José Tadeu Tesseroli de. **Regeneração óssea guiada através de barreira exposta ao meio bucal após exodontias**. Relato de caso. **Rev Bras Implant**, v. 7, n. 10, p. 5-7, 2010. Disponível em: ‹http://boneheal.inpbiomedical.com/wp-content/uploads/2012/05/06-ROG-atrav%C3%A9s-de-barreira-exposta-ao-meio-bucal-ap%C3%B3s-exodontias.-Relato-de-caso-IBI-2010.pdf. Acesso em: 12 de jul. de 2019.

16. SILVA, Viviane Viana. **Aplicação de biomateriais em ortopedia e engenharia de tecido ósseo**. Revista Saúde e Meio Ambiente, v. 5, n. 2, p. 14-27, 2017. Disponível em: ‹http://www.seer.ufms.br/ojs/index.php/sameamb/article/view/4151/pdf_24›. Acesso em: 12 de jul. de 2019.

17. SINHORETI, Mário Alexandre Coelho; VITTI, Rafael Pino; CORRER-SOBRINHO, Lourenço. Biomateriais na Odontologia: panorama atual e perspectivas futuras. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**, v. 67, n. 4, p. 256-261, 2013. Disponível em: ‹http://revodonto.bvsalud.org/pdf/apcd/v67n4/a02v67n4.pdf›. Acesso em: 09 de agosto de 2019.

18. TURRI, Alberto et al. **Guided bone regeneration is promoted by the molecular events in the membrane compartment**. Biomaterials, v. 84, p. 167-183, 2016. Disponível em: ‹https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S014296121600048X?token=ED19E3B9AF871E6C7165B25F767249C2099D0D5E1486CBB801FB63E0829C58E0D6A94F885A3A74DC52E1D9CA71B70CC7›. Acesso em: 12 de jul. de 2019.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

PRODUÇÃO DE MEMBRANA BARREIRA PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA COM ZEÍNA

CRISTIANE MICHELE ALVES DE OLIVEIRA1; ORIENTADORA: ELIANE TROVATTI2



Amostra – Moagem seca do grão de milho

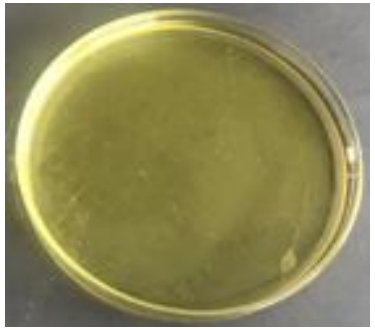


Amostra com solução isopropol sobre agitação e aquecimento por 30 minutos

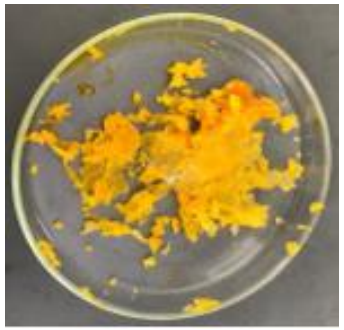


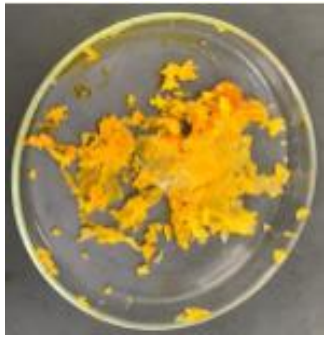
Separação por filtragem da amostra do líquido após agitação e aquecimento

Líquido filtrado e adicionado em refrigerador comum para precipitação

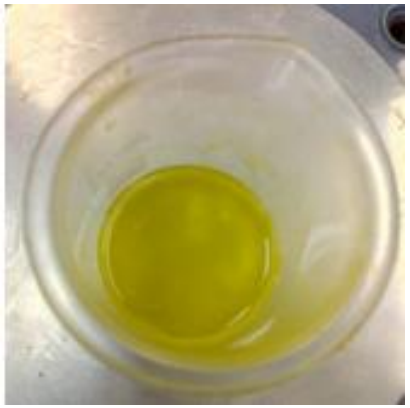


Após precipitação, a proteína foi removida e lavada com hexano para a remoção das gorduras





Proteína após extração

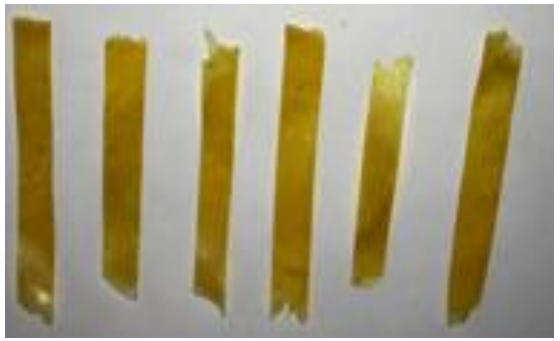




Proteína diluída em álcool a 70% e colocada em evaporação



Membrana após evaporação



Membrana após prensa hidráulica e recortada

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATO DA CASCA DE PINHÃO (SEMENTES DE *Araucaria angustifolia*) ENCAPSULADO EM FIBRAS DE AMIDO SOLÚVEL DE BATATA

ÉLDER PACHECO DA CRUZ[1], LAURA MARTINS FONSECA[1], FRANCINE TAVARES DA SILVA[1], ELIEZER AVILA GANDRA[2], ELESSANDRA DA ROSA ZAVAREZE[2], CAROLINE DELLINGHAUSEN BORGES[2]

[1] Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal de Pelotas – elderpachecodacruz@gmail.com; laura_mfonseca@hotmail.com; francine-ts@hotmail.com
[2] Docente da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – gandraea@hotmail.com; elessandrad@yahoo.com.br; caroldellin@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze é distribuída no hemisfério sul e concentrada no sul do Brasil. As sementes dessa conífera são denominadas de pinhão, e apesar de sua importância e alta funcionalidade, poucos estudos vêm sendo realizados visando elucidar as propriedades e aplicações das diferentes partes dessa planta, em especial sua casca (BRANCO; RODRIGUES, 2016).

A casca do pinhão é considerada um resíduo agroindustrial não explorado e normalmente descartado no meio ambiente (LIMA et al., 2007). No entanto, apresenta em sua composição compostos fenólicos, os quais, estão relacionados com a atividade antioxidante que atua em retardar e/ou inibir a oxidação de produtos alimentícios (FONSECA et al, 2020). Esses compostos bioativos mostram baixa estabilidade frente a diversos fatores, sendo facilmente degradados, apresentando uma aplicação restrita (KRICHENE et al., 2015). A técnica de *electrospinning* se destaca na encapsulação de compostos bioativos, por não envolver altas temperaturas ou pressões ao produzir materiais em escala nanométrica. A encapsulação é capaz de preservar a integridade estrutural dos bioativos, além de protegê-los e entregá-los em locais desejados de forma controlada e/ou específica (FANG; BHANDARI, 2010; FONSECA et al, 2020).

Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antioxidante frente ao radical DPPH• do extrato da casca de pinhão (ECP) e das fibras de amido solúvel de batata incorporadas com ECP, produzidas pela técnica de *electrospinning*.

2. METODOLOGIA

O pinhão foi adquirido em agosto de 2018, de um produtor da cidade de Vacaria (Latitude: 28° 30' 39'' Sul, Longitude: 50° 55' 47'' Oeste), Rio Grande do Sul, Brasil. O extrato da casca de pinhão (ECP) foi produzido de acordo com estudo anterior e apresentou 225,32 ± 0,89 $mg.g^{-1}$ de compostos fenólicos totais (FONSECA et al., 2020). Para a produção das fibras de amido foi utilizado amido solúvel de batata ($C_6H_{10}O_5$, Sigma-Aldrich, CAS 9005-25-8) com teor de amilose de 32,5 ± 3,6% e ácido fórmico (85% de pureza, Synth, CAS 01A1034.01).

Primeiramente, foram preparadas as soluções poliméricas formadoras de fibras utilizando 5 g de amido solúvel de batata (50%, p/v) em 10 mL de ácido fórmico 75% (em água ultrapura, v/v). A solução foi agitada em agitador magnético por 24 h para dissolução total e para atingir a gelatinização do amido. Após ficou em descanso por 24 h. O extrato da casca de pinhão (ECP) foi incorporado à solução nas concentrações de 0,5% e 1,5% (p/p) em base seca, e agitado em agitador magnético por 30 min para completa homogeneização.

As soluções poliméricas foram utilizadas para produção de fibras de amido para encapsular o ECP pela técnica de *electrospinning*. As soluções foram colocadas em uma seringa plástica de 3 mL com agulha de aço inoxidável de 0,8 mm de diâmetro e bombeadas a uma taxa de fluxo constante de 0,60 $mL.h^{-1}$ por uma bomba de infusão de seringa (KD Scientific, Model 100, Holliston, Inglaterra). Uma placa coletora de aço inoxidável aterrada foi posicionada a 20 cm da ponta da agulha. Uma fonte de alimentação (Instor, INSES-HV30, Brasil) foi utilizada para aplicar uma tensão de 25 kV no sistema. As fibras de amido foram produzidas à temperatura ambiente (25 ± 2 ºC) e a umidade relativa ajustada em 45 ± 2% com um desumidificador.

A atividade antioxidante *in vitro* do ECP e das fibras de amido/ECP foi avaliada pela capacidade de eliminar o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH•) (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). A solução estoque foi preparada com 24 mg de DPPH• em 100 mL de metanol, após uma alíquota de 10 mL dessa solução foi diluída em 45 mL de metanol e a absorbância foi ajustada para 1,10 ± 0,02, a 515 nm. As amostras do ECP e das fibras foram pesadas (10 mg) e adicionadas a 3,9 mL do radical DPPH•, agitadas em vórtex por 3 s e mantidas no escuro por 2 h 30 min de reação. A absorbância foi medida a 515 nm, utilizando um espectrofotômetro (SpectraMax 190, leitor de microplacas, Molecular Devices, EUA). A capacidade de eliminação do radical foi calculada usando a Equação 1. Em que, $Abs_{amostra}$ é a absorbância do ECP ou das fibras e Abs_{branco} é a absorbância da solução com a adição do DPPH e sem a amostra. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do radical DPPH•, sendo calculados em base seca.

$$\text{Inibição do DPPH•}\ (\%) = 100 - \frac{(Absamostra\ -\ Absbranco)}{Absbranco} \times 100 \quad \text{(Equação 1)}$$

Os dados da atividade antioxidante foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey foi aplicado para comparar as médias ao nível de significância estatística de $p \leq 0,05$.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta a atividade antioxidante do extrato da casca de pinhão (ECP) e das fibras de amido incorporadas com ECP.

Tabela 1. Atividade antioxidante frente ao radical DPPH• das fibras e do ECP.

Amostra	Inibição do DPPH (%)
ECP livre[1]	85,2 ± 0,6 [a]
Fibras de amido com 0,5% ECP	17,5 ± 0,9 [b]
Fibras de amido com 1,0% ECP	18,9 ± 1,1 [b]

[1] ECP: Extrato da casca de pinhão livre
[a,b,c] Valores com letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

O ECP livre apresentou inibição de 85% do radical DPPH, sendo semelhante ao valor relatado por Sant'Anna et al. (2016), ao avaliar um extrato aquoso da casca de pinhão (87% de inibição). Não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) no percentual de inibição entre as diferentes concentrações de ECP (0,5% e 1,0%) nas fibras de amido, apresentando 17,5% e 18,9% de inibição, respetivamente.

O ECP livre apresentou poder de inibição superior ($p \leq 0,05$) aos valores obtidos para as fibras de amido/ECP. Esses resultados podem ser justificados em razão do menor teor de compostos fenólicos nas fibras de amido/ECP em relação ao ECP livre como relatado por Fonseca et al. (2020), além da proteção dos compostos e possível redução no perfil de liberação.

Vafania, Fathi e Soleimaniam-Zad (2019) ao nanoencapsular o óleo essencial de tomilho em nanofibras de quitosana-gelatina pela técnica de *electrospinning* e avaliar a atividade antioxidante pelo método DPPH por 18 dias, relataram comportamento similar do atual estudo, tal que, a atividade antioxidante do óleo essencial de tomilho foi significativamente maior do que o óleo essencial encapsulado para o primeiro dia de medição. Entretanto, após 12 e 18 dias, o óleo essencial encapsulado exibiu maior atividade antioxidante do que óleos essenciais puros. Assim, ensaios com maior tempo de reação com o radical podem propiciar a liberação gradual dos compostos fenólicos, apresentando atividade antioxidante durante um maior período de tempo.

A partir dos resultados da atividade antioxidante, é possível sugerir que as fibras de amido/ECP podem ser utilizadas na indústria de alimentos e de embalagens, uma vez que, mesmo em baixas concentrações de ECP incorporados às fibras de amido, elas apresentam atividade antioxidante frente ao radical DPPH. Vale destacar que os antioxidantes naturais, normalmente, não são prejudiciais à saúde humana (GÓMEZ-ESTACA et al., 2014), e com isso vem se buscando cada vez mais opções de entrega desses compostos.

Não foram encontrados dados na literatura relatando ECP como agente antioxidante frente ao radical DPPH• (radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil). Apesar disso, sua avaliação é extremamente importante, pois o radical DPPH• é caracterizado como um radical orgânico livre estável e que possui muitas vantagens, tais como uma boa estabilidade na ausência da luz, aplicabilidade, simplicidade e viabilidade. Além disso, o radical DPPH é prejudicial, causando oxidação, e em razão disso, dever ser eliminado (DENG; CHENG; YANG, 2011).

4. CONCLUSÕES

O extrato da casca de pinhão apresentou maior atividade antioxidante comparadas as fibras de amido incorporadas com ECP, em função da menor quantidade de compostos fenólicos presentes nas fibras e a possível proteção dos compostos fenólicos nas fibras com uma liberação lenta.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Food Science and Technology**. v. 28, p. 25-30, 1995.

DENG, J.; CHENG, W.; YANG, G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. **Food Chemistry.** v. 125, n. 4, p. 1430-1435, 2011.

FANG, Z; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols – A review. **Trends in Food Science and Technology**. v.21, p.510-523, 2010.

FONSECA, L.M.; OLIVEIRA, J.P.; CRIZEL, R.L.; SILVA, T.F.; ZAVAREZE, E.R.; BORGES, C.D. Electrospun starch fibers loaded with pinhão (*Araucaria angustifolia*) coat extract rich in phenolic compounds. **Food Biophysics**. 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11483-020-09629-9>. Acesso em julho de 2020.

GÓMEZ-ESTACA, J.; LÓPEZ-DE-DICASTILLO, C.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; CATALÁ, R.; GAVARA, R. Advances in antioxidant active food packaging. **Trends in Food Science and Technology**. v.35, p.42–51, 2014.

KRICHENE, D.; SALVADOR, M. D.; FREGAPANE, G. Stability of virgin olive oil phenolic compounds during long-term storage (18 months) at temperatures of 5-50°C. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.63, p. 6779–6786, 2015.

LIMA, E.C.; ROYER, B.; VAGHETTI, J.C.P.; BRASIL, J.L.; SIMON, N.M.; JUNIOR, A. SANTOS.; PAVAN, F.A.; DIAS, S.L.P.; BENVENUTTI, E.V.; SILVA, E.A. Adsorption of Cu(II) on *Araucaria angustifolia* wastes: Determination of the optimal conditions by statistic design of experiments. **Journal of Hazardous Materials**. v.140, p.211-220, 2007.

MICHELON, F.; S. BRANCO, C.; CALLONI, C.; GIAZZON, I.; AGOSTINI, F. K. W.; Spada P.; Salvador, M. *Araucaria Angustifolia*: A Potential Nutraceutical with Antioxidant and Antimutagenic Activities. **Current Nutrition & Food Science**, v. 8, n.3, p.155–159, 2012.

SANT'ANNA, V.; SFOGLIA, N. M.; MERCALI, G. D.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Effect of cooking on polyphenols and antioxidant activity of *Araucaria angustifolia* seed coat and evaluation of phytochemical and microbiological stability over storage**. International Journal of Food Science & Technology**. v.51, p.1932-1936, 2016.

VAFANIA, B.; FATHI, M.; SOLEIMANIAN-ZAD, S. Nanoencapsulation of thyme essential oil in chitosan-gelatin nanofibers by nozzle-less electrospinning and their application to reduce nitrite in sausages. **Food and Bioproducts Processing**. v.116, p.240-248, 2019.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA
Pós-Graduação
PPGB Programa de Pós Graduação em Biotecnologia

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATO DA CASCA DE PINHÃO (SEMENTES DE *Araucaria angustifolia*) ENCAPSULADO EM FIBRAS DE AMIDO SOLÚVEL DE BATATA

PPGCTA

ÉLDER PACHECO DA CRUZ[1], LAURA MARTINS FONSECA[1], FRANCINE TAVARES DA SILVA[1], ELIEZER AVILA GANDRA[2], ELESSANDRA DA ROSA ZAVAREZE[2], CAROLINE DELLINGHAUSEN BORGES[2]



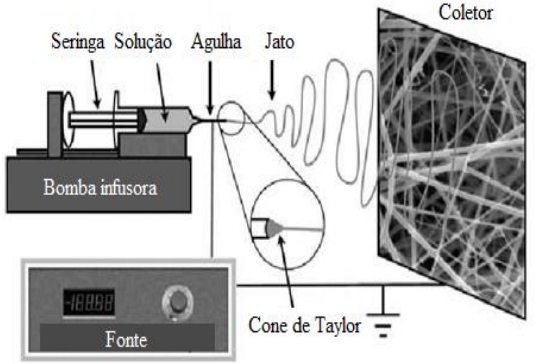
Pinhão (Sementes de *Araucaria angustifolia)*



Extrato da casca de pinhão (ECP)



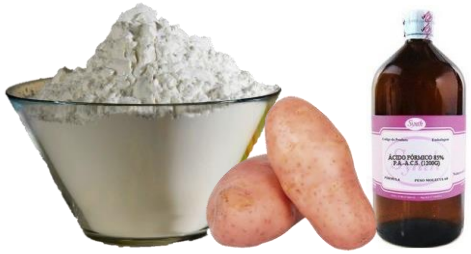
Soluções poliméricas (0,5 e 1,5% de ECP)



Obtenção das fibras pela técnica de *Electrospinning*



DPPH•



Amido de batata (50%) e Acido fórmico (75%)



Espectrofotômetro a 515 nm

Agradecimentos:
CNPq Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
FAPERGS
CAPES

FIBRAS DE AMIDO SOLÚVEL DE BATATA INCORPORADAS COM EXTRATO DA CASCA DE PINHÃO (SEMENTES DE *Araucaria angustifolia*): ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

ÉLDER PACHECO DA CRUZ[1], LAURA MARTINS FONSECA[1], MARJANA RADÜNZ[1], ELIEZER AVILA GANDRA[2], ELESSANDRA DA ROSA ZAVAREZE[2], CAROLINE DELLINGHAUSEN BORGES[2]

[1] Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal de Pelotas – elderpachecodacruz@gmail.com; laura_mfonseca@hotmail.com; marjanaradunz@gmail.com
[2] Docente da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – gandraea@hotmail.com; elessandrad@yahoo.com.br; caroldellin@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A *Araucaria angustifolia* (Bertolini) Otto Kuntze, pertence à família Araucariaceae e sua distribuição no Brasil concentra-se nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. O fruto dessa conífera é conhecido como pinha e sua semente como pinhão (ANSELMINI, 2005). Normalmente, a casca do pinhão é descartada, sendo considerada um subproduto agroindustrial importante, por representar cerca de 20% do peso total da semente (LIMA et al., 2007). No entanto, a casca do pinhão apresenta em sua composição, compostos fenólicos, os quais são relacionados às atividades antioxidante e antimicrobiana apresentando potencial para diversas aplicações (FONSECA et al., 2020).

Devido a sua alta instabilidade e por se degradar facilmente sob ação de elementos externos, como luz, oxigênio e altas temperaturas, os compostos fenólicos podem ser encapsulados em materiais com capacidade de protegê-los preservando sua integridade estrutural e sua bioatividade (FANG; BHANDARI, 2010). Assim, diferentes técnicas são utilizadas para nanoencapsular bioativos alimentares, onde a técnica de *electrospinning* se destaca por apresentar processamento simples e alta eficiência de encapsulação (FONSECA et al, 2020). Deste modo, objetivou-se determinar a atividade antimicrobiana do extrato da casca de pinhão (ECP) rico em compostos fenólicos e das fibras de amido incorporadas com extrato da casca de pinhão.

2. METODOLOGIA

O pinhão foi adquirido em agosto de 2018, de um produtor da cidade de Vacaria (Latitude: 28° 30' 39" Sul, Longitude: 50° 55' 47" Oeste), Rio Grande do Sul, Brasil. O extrato da casca de pinhão (ECP) liofilizado foi produzido de acordo com estudo anterior e apresentou 225,32 ± 0,89 $mg.g^{-1}$ de compostos fenólicos totais (FONSECA et al., 2020). Para a produção das fibras de amido foi utilizado amido solúvel de batata ($C_6H_{10}O_5$, Sigma-Aldrich, CAS 9005-25-8) com teor de amilose de 32,5 ± 3,6% e ácido fórmico (85% de pureza, Synth, CAS 01A1034.01).

Primeiramente, foram preparadas as soluções poliméricas formadoras de fibras utilizando 5 g de amido solúvel de batata (50%, p/v) em 10 mL de ácido

fórmico 75% (em água ultrapura, v/v). A solução foi agitada em agitador magnético por 24 h para dissolução total e para atingir a gelatinização do amido. Após ficou em descanso por 24 h. O extrato da casca de pinhão (ECP) foi incorporado à solução nas concentrações de 0,5% e 1,5% (p/p) em relação ao amido, e agitado em agitador magnético por 30 min para completa homogeneização.

As soluções poliméricas foram utilizadas para produção de fibras de amido para encapsular o ECP pela técnica de *electrospinning*. As soluções foram colocadas em uma seringa plástica de 3 mL com agulha de aço inoxidável de 0,8 mm de diâmetro e bombeadas a uma taxa de fluxo constante de 0,60 $mL.h^{-1}$ por uma bomba de infusão de seringa (KD Scientific, Model 100, Holliston, Inglaterra). Uma placa coletora de aço inoxidável aterrada foi posicionada a 20 cm da ponta da agulha. Uma fonte de alimentação (Instor, INSES-HV30, Brasil) foi utilizada para aplicar uma tensão de 25 kV no sistema. As fibras de amido foram produzidas à temperatura ambiente (25 ± 2 ºC) e a umidade relativa ajustada em 45 ± 2% com um desumidificador.

Para a determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* do ECP e das fibras foram utilizadas cepas padrão das espécies de bactérias *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832). Para a realização da análise de disco difusão em ágar foi semeada, em placas de ágar Muller-Hinton, uma alçada da solução salina padronizada contendo o inóculo. Em seguida foram adicionados discos de papel filtro esterilizados com diâmetro de 6 mm e sob os discos foram pipetados 5 µL de ECP (dissolvido em água ultrapura), sendo as placas incubadas por 24 h a 37 ºC. Após esse período, foi efetuada a medição dos halos de inibição com auxílio de um paquímetro, sendo os resultados expressos em milímetros (CLSI, 2015).

A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) foram mensuradas de acordo com os métodos descritos por Cabral et al. (2009), com modificações. Para a realização da CIM, foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços, em que foram acrescentados em cada poço 100 µL de caldo de infusão cérebro-coração (BHI), 100 µL de inóculo, 80 µL de caldo BHI e 20 µL de água salina (0,85%, p/v) com crescimento bacteriano. No ensaio foi adicionado o ECP em cinco diferentes concentrações (100, 20, 10, 1 e 0,1 $mg.mL^{-1}$) e as fibras de amido/ECP em três concentrações (100, 20 e 10 $mg.mL^{-1}$). As placas foram lidas em espectrofotômetro de placas (SpectraMax 190, leitor de microplacas, Molecular Devices, EUA), a 620 nm. Em seguida, procedeu-se a incubação por 24 h a 37 ºC, e após, foi realizada uma nova leitura em espectrofotômetro. A CIM foi considerada como a menor concentração em que não houve crescimento bacteriano no meio de cultura. Após a realização da CIM, foram retirados 15 µL dos poços das amostras que apresentaram inibição e estes estriados em placas de Petri com ágar Padrão para Contagem (PCA) e logo incubados por 24 h a 37 °C. Assim, foi considerada a CBM aquela correspondente às placas em que não houve crescimento bacteriano.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta a atividade antimicrobiana do ECP e das fibras de amido incorporadas com diferentes concentrações de ECP.

Tabela 1. Disco difusão, CIM e CBM do ECP livre e das fibras de amido contendo ECP em diferentes concentrações, frente às cepas bacterianas de *S. aureus* e *E. coli* O157:H7

Amostras[1]	*E. coli* O157:H7 (ATCC 43895)			*S. aureus* (ATCC 10832)		
	Difusão[2]	CIM[3]	CBM[4]	Difusão	CIM	CBM
ECP (Livre)	5,3	10	Nd[5]	4,7	1	10
Fibras 0,5% ECP	-	Nd	Nd	-	10	Nd
Fibras 1,5% ECP	-	Nd	Nd	-	Nd	Nd

[1]ECP: Extrato da casca de pinhão livre; fibras com 0,5 e 1,5% de ECP; [2]Disco difusão (mm); [3]CIM: Concentração Inibitória Mínima (mg.mL^{-1}) [4]CBM:Concentração Bactericida Mínima (mg.mL^{-1}); [5] Nd: Não detectado

Referente ao teste de difusão em ágar pode-se observar a atividade antimicrobiana do ECP frente a *S. aureus* (ATCC 10832) e *E. coli* (ATCC 43895), sendo obtidos halos de inibição de 4,7 mm e 5,3 mm, respectivamente. Segundo Arora e Kaur (1999), a presença e o tamanho dos halos de inibição obtidos pela técnica de disco difusão em ágar, indicam a suscetibilidade das bactérias frente a óleos essenciais ou extratos. Quando obtidos halos de inibição menores que 7 mm, considera-se pouco ativo frente a bactéria, e quando apresentarem diâmetro maior que 12 mm são considerados de efeito inibitório satisfatório (ARORA; KAUR, 1999). De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, para o teste de disco de fusão em ágar para as bactérias *S. aureus* e para *E. coli*, o ECP apresentou-se pouco ativo.

O ECP apresentou efeito inibitório na concentração de 1 mg.mL^{-1} frente a bactéria *S. aureus* e na concentração de 10 mg.mL^{-1} frente a bactéria *E. coli*. As fibras de amido com 0,5% de ECP apresentaram efeito inibitório na concentração de 10 mg.mL^{-1}. Nas demais fibras não foram detectadas CIM. De acordo com Duarte et al. (2007), um óleo essencial ou extrato que apresenta valor de CIM de até 0,5 mg.mL^{-1} é considerado um forte agente antimicrobiano e entre 0,6 a 1,5 mg.mL^{-1} possuiu um efeito moderado. Portanto, o ECP frente à cepa de *S. aureus* apresentou um efeito moderado, e o ECP e as fibras de amido com 0,5% de ECP apresentaram uma fraca atividade frente a cepa de *E. coli*. Entretanto, mesmo encapsulado em baixa quantidade, o composto apresentou-se efetivo contra as bactérias avaliadas. Foi possível observar que o ECP apresentou efeito bactericida com resultados de CBM somente na concentração de 10 mg.mL^{-1}, frente a bactéria *S. aureus*, já as fibras não apresentaram efeito bactericida frente a essa bactéria. Não foi observado efeito tanto do ECP como das fibras frente à cepa de *E. coli*.

As bactérias Gram negativas, por possuírem uma membrana externa, composta por lipopolissacarideos, são mais resistentes à passagem de moléculas antibacterianas. Desta forma, foi possível visualizar melhor ação frente à bactéria Gram + (*S. aureus*) quando comparada com a Gram - (*E. coli*), devido às características estruturais da parede celular bacteriana (NAZZARO; FRATIANNI; MARTINO, 2013).

4. CONCLUSÕES

O extrato da casca de pinhão (ECP) apresentou efeito inibitório frente às cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832) e *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895). No entanto, somente as fibras de amido com 0,5% de ECP apresentaram atividade antimicrobiana frente a *S. aureus.*

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSELMINI, J.I. **Fenologia reprodutiva da *Araucaria angustifólia* (Bert.) O. Ktze, na região de Curitiba - PR**. (Dissertação de Mestrado). 2005. 62f. Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

ARORA, D.S.; KAUR, J. Antimicrobial activity of spices. **International Journal of Antimicrobials Agents**. v.12, p.257-262, 1999.

CABRAL, I.S.R.; OLDONI, T.L.C.; PRADO, A.; BEZERRA, R.M.N.; ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P.L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira**. Química Nova**. v.32, p.1523-1527, 2009.

CLSI. (2015). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard** — Nona edição. (Vol. 35).

DUARTE, M.C.T.; LEME, C.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L. G. Effects of essential oils from medicinal plants used in Brazil against epec and etec *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. v. 8, p. 139-143, 2007.

FANG, Z; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols – A review. **Trends in Food Science and Technology**. v.21, p.510-523, 2010.

FONSECA, L.M.; OLIVEIRA, J.P.; CRIZEL, R.L.; SILVA, T.F.; ZAVAREZE, E.R.; BORGES, C.D. electrospun starch fibers loaded with pinhão (*Araucaria angustifolia*) coat extract rich in phenolic compounds. **Food Biophysics**. 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11483-020-09629-9>. Acesso em julho de 2020.

LIMA, E.C.; ROYER, B.; VAGHETTI, J.C.P.; BRASIL, J.L.; SIMON, N.M.; JUNIOR, A.; SANTOS.; PAVAN, F.A.; DIAS, S.L.P.; BENVENUTTI, E.V.; SILVA, E.A. Adsorption of Cu(II) on *Araucaria angustifolia* wastes: Determination of the optimal conditions by statistic design of experiments. **Journal of Hazardous Materials**. v.140, p.211-220, 2007.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; MARTINO, L. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**. v. 6, p. 1451–1474, 2013.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA

Saúde única

IV MOSTRA ACADÊMICA

Graduação

PPGB Programa de Pós Graduação em Biotecnologia

PPGCTA

FIBRAS DE AMIDO SOLÚVEL DE BATATA INCORPORADAS COM EXTRATO DA CASCA DE PINHÃO (SEMENTES DE *Araucaria angustifolia*): ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

ÉLDER PACHECO DA CRUZ[1], LAURA MARTINS FONSECA[1], MARJANA RADÜNZ[1],
ELIEZER AVILA GANDRA[2], ELESSANDRA DA ROSA ZAVAREZE[2], CAROLINE DELLINGHAUSEN BORGES[2]



Pinhão (Sementes de *Araucaria angustifolia)*



Extrato da casca de pinhão (ECP)



Reativação das bactérias
Escherichia coli O157:H7
(ATCC 43895)
Staphylococcus aureus
(ATCC 10832)



Disco Difusão



Concentração Bactericida Mínima (CBM)

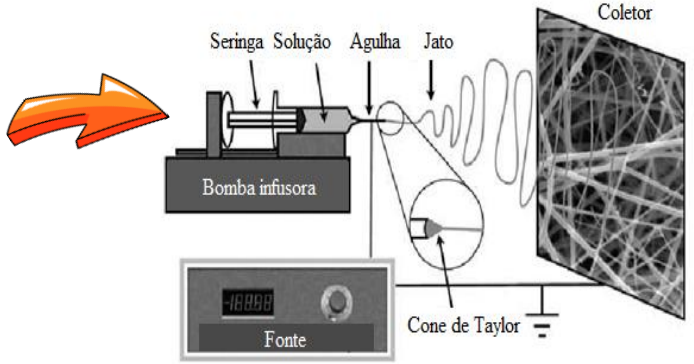




Amido de batata (50%) e Acido fórmico (75%)



Soluções poliméricas (0,5 e 1,5% de ECP)



Obtenção das fibras pela técnica de *Electrospinning*



Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Agradecimentos:

CNPq Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FAPERGS

CAPES

Estudo da citotoxicidade dos extratos de *Passiflora foetida* L. e *Passiflora morifolia* Mast. em linhagens de células tumorais *in vitro*

OHANA LUIZA SANTOS DE OLIVEIRA[1]; OSCAR CAETANO DA SILVA NETO[2]; JORGE MAURÍCIO DAVID[3]; CRISTINA PUNGARTINIK[4]

[1]*Programe de Pós-graduação Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Federal da Bahia (UFBA) – ohanaluiza@hotmail.com*
[2]*Intituto de Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA) – oscarcaetano@hotmail.com*
[3]*Intituto de Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA) – jmdavid@ufba.br*
[4]*Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) – cpungartnik@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora*, pertencente à família Passifloraceae, abriga cerca de 525 espécies (CERVI; IMIG, 2013). Considerado o maior gênero dentro da família, suas espécies encontram-se distribuídas amplamente na região Neotropical (ULMER; MACDOUGAL, 2004) e dispõe de quatro subgêneros: *Passiflora, Decaloba, Astrophea* e *Deidamioides* (FEUILLET; MACDOUGAL, 2004). A região Centro-Norte do Brasil abriga a grande maioria das espécies descritas no gênero *Passiflora* (BERNACCI et al., 2015) sendo que nosso país é centro de origem e dispersão deste taxa, e o total de 146 espécies foram descritas no território brasileiro (OLIVEIRA, 2017).

A grande variabilidade destes recursos vegetais nos remete a importância dos estudos biotecnológicos. A identificação e caracterização das substâncias produzidas por estas plantas pode resultar em moléculas úteis para produção de fitoterápicos, fitofármacos, cosmecêuticos, medicamentos, biopesticidas, dentre outros.

Publicações na literatura científica utilizando *P. foetida* subgênero *Passiflora*, espécie silvestre, evidenciou que esta planta tem atividade antibacteriana (MOHANASUNDARI et al., 2007), analgésica e antiinflamatória (SASIKALA et al., 2011). Os fitocompostos encontrados em maior quantidade em *P. foetida* são alcalóides, fenóis, flavonóides glicosídicos e compostos cianogênicos (DHAWAN et al., 2004). Quanto a *Passiflora morifolia* subgênero *Decaloba* os principais compostos encontrados por isolamento são glicosídeos cianogênicos, flavonóides, glicosídeos diversos, antocianinas e ácidos graxos (GOSMANN et al., 2011).

Assim o objetivo deste estudo foi verificar a citoxicidade *in vitro* de extratos de folhas de *P. Foetida* e *P. Morifolia* em linhagens de células tumorais.

2. METODOLOGIA

As amostras (folhas jovens colhidas das plantas que estavam em crescimento em casa de vegetação) foram submetidas à secagem em estufa de ar circulante por sete dias, a 30 °C na Universidade Estadual de Santa Cruz. Após esse período, foram acondicionadas em sacos plásticos transparentes e devidamente identificadas e enviadas para processamento e análise na Universidade Federal da Bahia. Os extratos brutos foram obtidos a partir do processamento das folhas de cada uma das espécies pulverizado em liquidificador e a granulometria foi padronizada com tamiz de 16 mesh (1,00 mm de malha). O material pulverizado foi submetido ao líquido extrator na proporção etanol:água (64:36 v/v), acondicionadas num erlenmeyer e submetidas agitação sem aquecimento por 48h. Após esse processo, o conteúdo foi filtrado a vácuo e concentrado sob pressão reduzida em evaporador rotatório a 55 ºC, até a completa remoção do solvente, resultando nos respectivos extratos brutos.

Os extratos brutos foram diluídos em DMSO puro estéril na concentração de 10mg/mL. As amostras foram testadas em concentrações que variaram de 0,19-50µg/mL. Foram utilizadas células HCT116 (carcinoma de cólon humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano) obtidas da ATCC. As células foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm3, volume de 250 mL), os meios utilizados foram RPMI 1640 e suplementados com 10% de soro bovino fetal.

As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5 % de CO2 a 37 ºC. Para avaliar a citotoxicidade das substâncias, o ensaio do alamar blue foi realizado após 72 horas de exposição com as substâncias teste. O alamar blue, identificado como resazurina (O'BRIEN et al., 2000), é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. O controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. As absorbâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado) utilizando uma leitora de placa (AHMED et al., 1994). A porcentagem de inibição foi calculada e registrada a percentagem de inibição x log da concentração e determinado suas IC50 realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 apresenta os dados de IC50 obtidos. Segundo o nosso programa de triagem de drogas citotóxicas, extratos com valores de IC50 < 30 µg/mL e compostos puros com IC50 < 4 µg/mL são considerados promissores (SUFFNESS & PEZZUTO, 1990; BOIK, 2001). Observando os valores obtidos para as amostras P01 e P02, extrato bruto de folhas de *P. foetida* e de *P. morifolia*, respectivamente, verifica-se que há baixa atividade citotóxica para as células tumorais testadas.

Tabela 1 – Valores de IC50 para a atividade citotóxica em linhagens de células tumorais *versus* não tumorais.

Amostras	HCT116	HepG2	MRC-5
P01	>50	>50	>50
P02	>50	>50	>50
DOX	**0,14**	**0,05**	**1,08**
	0,05 – 0,40	**0,04 – 0,06**	**0,75 – 1,55**

A tabela apresenta os valores de IC50 (concentração inibitória média), em µg/mL, e o respectivo intervalo de confiança de 95% obtido a partir de três experimentos independentes realizados em duplicata pelo método do Alamar blue após 72 horas de exposição com as células HCT116 (carcinoma de cólon humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano) obtidos por regressão não-linear através do programa GraphPad Prisma versão 5.0. Doxorrubicina (DOX) foi usada como controle positivo.

Observou-se através dos resultados obtidos que os extratos brutos de folhas de *P. morifolia* e *P. foetida* não apresentaram potencial citotóxico promissor para células tumorais testadas. O achado para *P. morifolia* corrobora com estudo realizado por Amaral et al., 2019 que apontou 4% de atividade contra carcinoma de cólon, 7% adenocarcinoma ovariano e 18% quando testada para inibição do crescimento de células de glioblastoma, todos de origem humana, pelo ensaio de MTT (sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil2-H-brometo de tetrazolium).

Em relação a *P. foetida* estudo realizado por Asadujjaman et al. (2014), exibiu 100% de mortalidade a uma concentração de 320 µg / mL em ensaio com *Artemia salina*, e o LC50 do extrato foi de 80 µg / mL, portanto os dados encontrados nesse estudo estão de acordo com a literatura, onde concentrações elevadas podem ter atividade citotóxica.

Não foram encontrados registros de ensaios anteriores para extratos brutos de *P. foetida* e *P. morifolia* para citotoxidade em células HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano). Essa análise fez parte de um *screening* inicial para determinação do potencial anticâncer destas amostras.

4. CONCLUSÕES

Diante do exposto, foi constatada a baixa de atividade citotóxica dos extratos das duas espécies. Não haviam sido realizados testes de citotoxidade

para duas das linhagens aqui empregadas em nenhum dos dois extratos brutos com registro na literatura. O trabalho segue em andamento com a caracterização química dos extratos, bem como realização de novos ensaios para avaliação de outras possíveis atividades biológicas (antifúngica, antimicrobiana e genotóxica), haja vista que encontramos relatos na literatura do uso dessas espécies para fins medicinais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S.A.; GOGAL, R.M.; WALSH, J.E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. **Journal of immunological methods**, v.170, p.211 - 224, 1994.

AMARAL, R. G. et al. Cytotoxic potential of 14 Passiflora species against cancer cells. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 13, n. 7, p. 157-166, abr. 2019.

ASADUJJAMAN, M.; MISHUK, A. U.; HOSSAIN, M. A.; KARMAKAR, U. K. Medicinal potential of *Passiflora foetida* L. plant extracts: biological and pharmacological activities. **Journal of Integrative Medicine.** Singapura, vol. 12, n. 2, p. 121-126, 2014.

BERNACCI, L. C. et al. Passifloraceae *In*: **Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2015. Acessado em 15 agosto 2020. Online. Disponível em: http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB12506

BOIK, J. **Natural compounds in cancer therapy**. Oregon Medical Press, Minnesota, USA, p. 25, 2001.

CERVI, A. C.; IMIG, D. C. A new species of *Passiflora* (Passifloraceae) from Mato Grosso do Sul, Brazil. **Phytotaxa**, vol. 103, p. 46-50, 2013.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora*: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**. Vol. 94, p. 1-23, 2004.

FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J. M. A New infrageneric classification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Passiflora**, vol. 13(2), p. 34-38, 2004.

GOSMANN, G.; PROVENSI, G.; COMUNELLO, L.N. & RATES, S.M. K. Composição química e aspectos farmacológicos de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Biociências**, vol. 9(s1), p. 88-99, 2011.

MOHANASUNDARI, S.; et al. Antibacterial properties of *Passiflora foetida* L. - a commom exotic medicinal plant. **African Journal of Biotechnology**, vol. 6(23): p. 2650-2653. 2007.

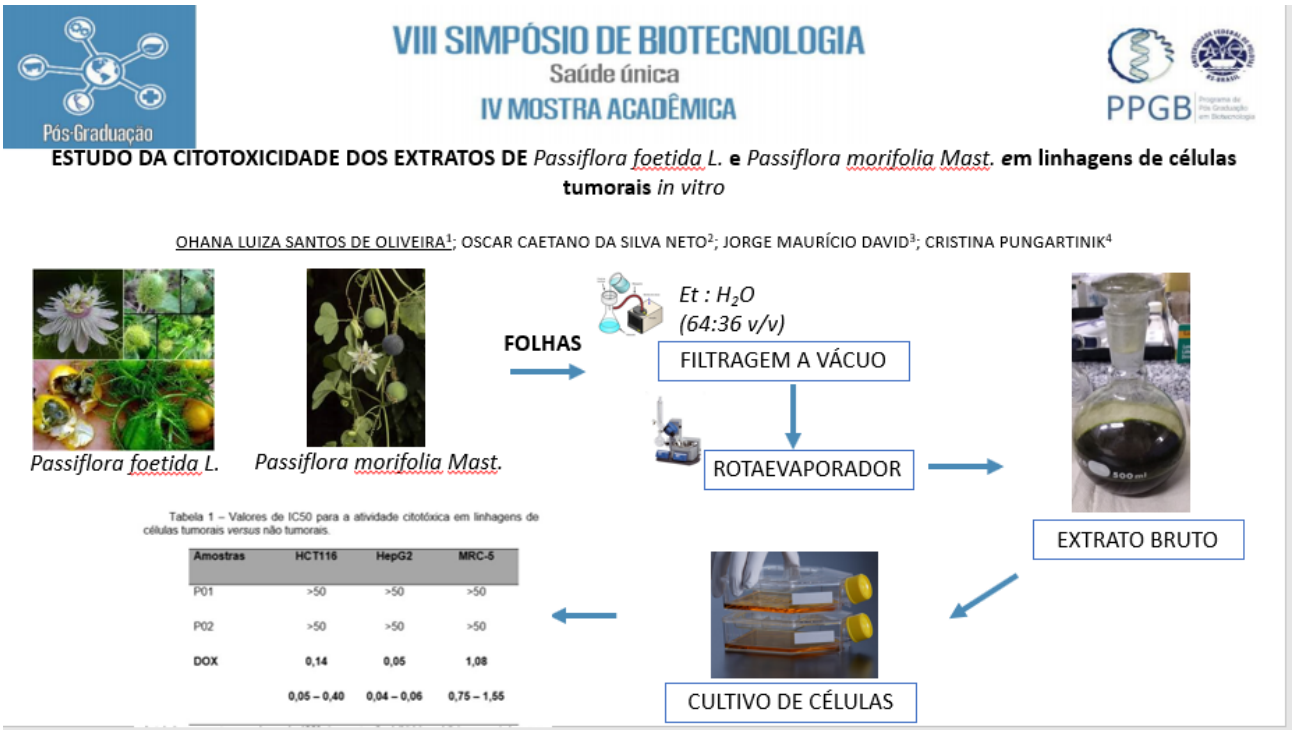
O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European journal of biochemistry**, v.267, p.5421 - 5426, 2000.

OLIVEIRA, O.L.S. **Análises genéticas e citogenética em espécies de Passiflora L. existentes no banco ativo de germoplasma (Bag-passifloras) da UESC**. 2017. 132p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, 2017.

SASIKALA. V.; SARAVANAN, S.; PARIMELAZHAGAN, T. Analgesic and anti-inflamatory activities of *Passiflora foetida* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 600-603. 2011.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J.M. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann K. Editor. **Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity.** London: Academic Press; 1990: 71–133.

ULMER, T.; MACDOUGAL, J. M. *Passiflora* - passionflowers of the world. **Timber Press**, Portland, 2004. 432p.



REAPROVEITAMENTO DE VEGETAIS PARA EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DNA

PRISCILA NISHIZAKI BORBA[1];
ELIANE TROVATTI [2]

[1] UNIARA – pri_cassimiro@hotmial.com
[2] UNIARA – elianetrov@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos as crescentes aplicações de biomateriais em áreas diversas estimulam a busca por novas matérias primas com propriedades como biodegradabilidade, baixa toxicidade e de fácil manuseio.

De modo geral o mercado de biomateriais é expressivo, com uma grande movimentação financeira nos últimos anos e constatado crescimento (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015), em áreas diversas, incluindo desde a área da saúde até engenharias. Biomateriais de origem natural vêem ganhando destaque devido às suas propriedades como biocompatibilidade e baixa toxicidade, além de variadas propriedades físicas, químicas e físico-químicas, como porosidade, permeabilidade, densidade, resistência à esterilização, degradabilidade, tensão de ruptura, alongamento e flexibilidade, que podem ser adaptadas à cada aplicação.

2. METODOLOGIA

Segundo Costa & Moura (2001) apud Rodrigues (2008), existem diversos protocolos que demonstram a metodologia aplicada para a extração de DNA, sendo os métodos variáveis em função da espécie e do tecido a ser utilizado para estudo. Porém, na maioria dos protocolos para a visualização dos aglomerados de DNA se faz necessário a realização dos processos de trituração, peneiramento, utilização da solução de lise, resfriamento do filtrado e diminuição da diluição do DNA com álcool (RODRIGUES et al., 2008).

O método de extração do DNA de vegetais é considerado simples e de baixo custo, pois são utilizados vegetais que muitas vezes são descartados por mercados, casas de frutas e indústrias alimentícias. Dentre os diversos vegetais existentes para extração, optou-se por realizar a pesquisa com as

frutas banana e laranja devido à abundância existente e pela quantidade de resíduos presentes nos mesmos.

A parte experimental foi desenvolvida em duas etapas Extração do DNA e Preparo dos Filmes, sendo ambas realizadas no laboratório da Etec Cel. Raphael Brandão, localizada na cidade de Barretos – SP e a Caracterização dos Filmes que foi realizado no laboratório da USP, localizada na cidade de São Carlos – SP.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração do DNA conta com etapas importantes para sua obtenção, destacando-se o processo de trituração, que tem como função proporcionar a quebra das células vegetais aumentando a superfície de contato com a solução de “lise”, portanto, quanto mais triturado o material estiver melhor será o rendimento. Em decorrência de sua composição a solução de “lise” ocasiona o rompimento das membranas celulares, liberando assim as moléculas de DNA que estão localizadas no núcleo. Dentre os componentes da solução o reagente lauril sulfato de sódio tem a finalidade de promover a desestruturação dos lipídeos, que são os principais componentes da membrana, provocando sua ruptura. O NaCl contribui com a neutralização das cargas negativas dos grupos fosfatos presentes no DNA, transformando o DNA em uma molécula insolúvel em etanol, favorecendo sua aglomeração (RODRIGUES et al., 2012).

4. CONCLUSÕES

O principal objetivo do trabalho, utilização de vegetais para extração e caracterização de DNA foi atingindo. O processo de extração demonstrou ser eficiente e vantajoso do ponto de vista de custo viável. A obtenção do DNA de vegetais se apresenta como um meio de reaproveitamento de resíduos em grande parte descartados pelas indústrias, na transformação de um material não tóxico e biodegradável aplicado como biomaterial.

Muitas moléculas funcionais são utilizadas na obtenção de biomateriais, porém, o uso de filmes derivados de DNA vegetal consiste em um material inovador e exclusivo. O desenvolvimento deste biomaterial contribui também para o campo de pesquisas, já que na literatura atual não se encontra ensaios

mecânicos aplicados em filmes de DNA originados de vegetais, sendo este fato uma exclusividade no trabalho em questão.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Biologia Molecular da Célula, 5a edição, Porto Alegre: Artmed, 2010.

ALVES, E. A.; SOUZA, D. S. Biologia molecular. In: MOLINARO, Etelcia Moraes; CAPUTO, Luzia Fátima Gonçalves; AMENDOEIRA, Maria Regina Reis (Org.). Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. v.3. Rio de Janeiro: EPSJV, 2013. p. 134-185.

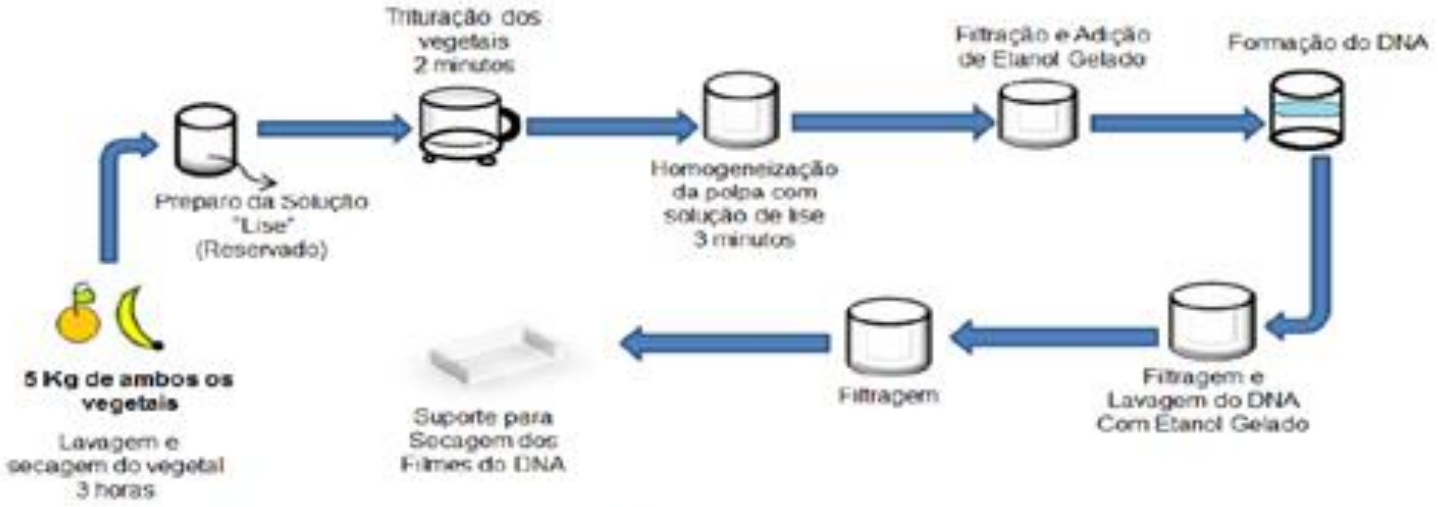
BARROS, T. T. de.; Produção e Caracterização de Filmes de Polpa de Mamão com adições de nanoestruturas, processados em modo batelada. Dissertação (Mestrado Programa de Pós Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de São Carlos. São Paulo. 2016.

CHRISTO, G. L. Biomassa de Resíduos de Hortifruticultura em Colombo – PR e Prospecção Preliminar para Geração de Biogás. Dissertação (Mestrado Programa de Pós Graduação Interinstitucional em Bioenergia). Universidade Federal do Paraná. Curitiba – PR. 2016.

HEPP, D.; NONOHAY, J. S. de. A importância das técnicas e análises de DNA. Scientia Tec: Revista de Educação, Ciência e Tecnologia do IFRS – Campus Porto Alegre, V.3, n.2, p:114-124, jun/dez 2016.

ORTIZ, E. História da Ciência no Ensino de Biologia: Virtudes e Dificuldades da Contextualização Histórica do Episódio da Dupla Hélice do DNA. Dissertação (Mestrado - Ensino de Ciências e Educação Matemática). Universidade Estadual de Londrina. Paraná. 2015.

PRISCILA NISHIZAKI BORBA
ORIENTADOR [2] ELIANE TROVATTI



Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DE *ALPHAHERPESVIRUS EQUIDEO* EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE EQUINOS DA REGIÃO SUL DO RIO GRANDE DO SUL

AMANDA DE OLIVEIRA BARBOSA[1]; TAMIRES ELLEN TOMIO[2]; LEONARDO CLASEN RIBEIRO[2]; ALICE SILVEIRA BECKER[3]; FRANCIELLE LIZ MONTEIRO[4]; MARCELO DE LIMA[5]

[1]Universidade Federal de Pelotas – barbosa.oamanda@gmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas – tamitomio@hotmail.com/leo_clasen92@hotmail.com
[3]Universidade Federal de Santa Maria – asilveirabecker@gmail.com
[4]Hospital de Clínicas de Porto Alegre – franciellemonteiro09@gmail.com
[5]Universidade Federal de Pelotas – mdelima.ufpel@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os *Alphaherpesvirus equideo* 1 e 4 (EHV-1 e EHV-4) são vírus DNA de aproximadamente 150kb, e possuem envelope (PATEL, 2005). Estão classificados na família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus* (ICTV, 2019). Ambos possuem distribuição mundial e causam perdas econômicas importantes nos rebanhos equinos acometidos (GILKERSON et al., 2015, OLADUNNI et al., 2019).

O EHV-1 infecta células endoteliais, epiteliais da mucosa respiratória, e mononucleares (causando uma viremia associada a células) (KAMEL et al, 2019). Dessa forma, a infecção pelo EHV-1 pode provocar doenças respiratórias, alterações vasculares, abortos e mieloencefalopatia (NEGUSSIE et al, 2017; HUSSEY, 2019). Entretanto, a infecção pelo EHV-4 é restrita ao trato respiratório, provocando traqueobronquite e rinofaringite (GILKERSON et al., 2015). Os sinais respiratórios causados pelo EHV-1 e EHV-4 são indistinguíveis clinicamente e, geralmente, são mais leves em equinos adultos e mais relevantes nos animais jovens (HUSSEY, 2019).

A transmissão do EHV-1 e EHV-4 pode ocorrer tanto de forma direta quanto indireta, seja por secreções, expectorações ou através de aerossóis. Em casos de abortamentos associados ao EHV-1, pode ocorrer a infecção do animal suscetível pelo contato com o conteúdo fetal, placentário e fluidos corporais. Após a infecção primária, os herpesvírus estabelecem latência em linfócitos e gânglio trigêmeo (FRANCO et al, 2017). Dessa forma, o animal torna-se portador e, em períodos de estresse e imunossupressão, pode ocorrer a reativação viral, contribuindo para a disseminação desses vírus nos rebanhos (GILKERSON et al., 2015; FRANCO et al, 2017).

Estudos sorológicos realizados no Brasil demonstram uma ampla disseminação do EHV-1 e EHV-4 na população equina, com soropositividade variando entre 4,5% a 45,5% nas regiões estudadas (DIEL et al., 2006; AGUIAR et al., 2008; DIAZ et al., 2015). Porém, os estudos sorológicos não permitem a discriminação entre anticorpos vacinais ou induzidos por infecção natural. Assim, considerando a importância epidemiológica, clínica e econômica desses patógenos, este trabalho teve como objetivo detectar e identificar geneticamente

os *Alphaherpesvirus equideo* (EHV-1 e EHV-4) em amostras clínicas de equinos da região sul do Rio Grande do Sul.

2. METODOLOGIA

Foram coletadas amostras de sangue total e secreção nasal de equinos de sete propriedades das cidades de Pelotas, Bagé, Jaguarão e Capão do Leão. As coletas aconteceram entre os meses de abril e junho de 2019, sendo coletadas 179 amostras de sangue total em tubos contendo EDTA e 110 amostras de secreção nasal, coletadas profundamente de ambas as narinas com *swabs* estéreis, e imediatamente embebidas em meio essencial mínimo (MEM) contendo antibióticos. As amostras foram mantidas sob refrigeração durante o transporte até o Laboratório de Virologia e Imunologia (LabVir) da UFPel, onde foram armazenadas a -80°C até o seu processamento.

A capa de leucócitos obtida a partir das amostras de sangue, e o *swab* nasal foram utilizados para a extração de DNA com o kit comercial *ReliaPrep™ Viral TNA Miniprep (Promega, Wisconsin, EUA)*, conforme instruções do fabricante. Em seguida, foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) do tipo semi-*nested multiplex* EHV-1/4 para amplificação de um fragmento do gene da glicoproteína B (gB). Os *amplicons* possuem 188pb para o EHV-1 e 677pb para o EHV-4 (WANG et al., 2007).

O volume final utilizado para a PCR foi de 25µL, contendo 100-200ng de DNA, 1x *GoTaq® Colorless Master Mix (Fitchburg, Wisconsin, EUA)* e 0,4µM de cada primer. As condições da PCR seguiram a referência dos *primers*. Na eletroforese foi utilizado o corante *Blue Green Loading Dye I* (Cotia, São Paulo, BR) em gel de agarose 1,5%, sendo aplicada voltagem de 100V durante 40 minutos. Posteriormente, o gel foi visualizado sob luz UV.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) sob o número 13938-2019.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 179 amostras de sangue total e 110 amostras de secreção nasal obtidas de sete propriedades da região sul do Rio Grande do Sul, com o objetivo de detectar e identificar geneticamente *alphaherpesvirus equideo* (EHV-1 e EHV-4) em amostras clínicas de equinos.

O EHV-1 foi detectado em 4,47% (8/179) das amostras de sangue e em 2,73% (3/110) das amostras de *swab* nasal. Já o EHV-4 foi detectado em 2,23% (4/179) das amostras de sangue e 8,18% (9/110) das amostras de *swab* nasal. No processamento das amostras de secreção nasal foi considerado o histórico recente de doença respiratória e/ou reprodutiva ou presença de sinais clínicos em alguns animais no momento da coleta. Dessa forma, apenas os *swabs* nasais dos animais das propriedades A, F e G foram testados na PCR.

Na propriedade A, somente as amostras de sangue total foram positivas na PCR, com 11,43% (8/70) das amostras positivas para EHV-1 e 5,71% (4/70) para o EHV-4. Nessa propriedade um animal apresentou coinfecção (EHV-

1/EHV-4). No momento da coleta os animais não apresentavam sinais clínicos, entretanto, o médico veterinário responsável relatou que havia histórico de abortos e doenças respiratórias nos últimos anos, sendo assim, a vacinação era frequente em todos os animais do rebanho. Wang et al. (2007) encontrou resultados semelhantes em um estudo realizado na Austrália com dois grupos de potros. Nesse experimento, foi detectado DNA do EHV-1 em sangue periférico e, assim como no presente estudo, todas as amostras de *swab* nasal foram negativas.

Na propriedade F, somente as amostras de *swab* nasal foram positivas na PCR, com 8,57% (3/35) positivas para EHV-1 e 22,86% (8/35) das amostras positivas para EHV-4. No momento da coleta, alguns animais apresentavam discreta secreção nasal mucosa/serosa/muco-purulenta, além disso, o médico veterinário responsável relatou histórico de doença respiratória em outros animais do rebanho. Nessa propriedade um animal apresentou coinfecção (EHV-1/EHV-4). Na propriedade G, uma amostra (1/5) de *swab* nasal foi positiva para EHV-4 na PCR.

Considerando o histórico dos animais, os resultados da PCR e a literatura, que aponta os linfócitos circulantes como um dos sítios de latência para o EHV-1 e EHV-4 (CARVALHO et al., 2000; PUSTERLA et al., 2010), os achados da propriedade A são sugestivos de infecção latente por ambos os vírus. Já nas propriedades F e G, onde o DNA do EHV-1 e EHV-4 foi detectado no *swab* nasal e havia presença de sinais respiratórios em alguns animais, os achados são sugestivos de infecção ativa e, provavelmente, excreção viral no momento da coleta. Entretanto, não podemos afirmar a relação direta entre os sinais respiratórios e a detecção desses vírus, uma vez que a presença de outros patógenos deve ser considerada.

A coinfecção encontrada em animais das propriedades A e F já foi descrita em outros estudos (WANG et al., 2007; NEGUSSIE et al., 2017). Entretanto, as consequências biológicas destes achados necessitam de investigações adicionais.

4. CONCLUSÕES

Os achados do presente estudo demonstram a identificação e caracterização genética do EHV-1 e EHV-4 em rebanhos de equinos da região sul do Rio Grande do Sul. Uma análise detalhada do perfil dos resultados sugere ainda a ocorrência de infecções agudas, latentes e coinfecções por estes vírus nos animais analisados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; LARA, M. C. C. S. H., et al. Prevalência de anticorpos contra agentes virais e bacterianos em equídeos do município de Monte Negro, Rondônia. Amazônia Ocidental Brasileira. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science,** v. 45, n. 4, p. 269-276, 2008.

CARVALHO, R.; OLIVEIRA, A.; SOUZA, A. M.; PASSOS, L. M. F.; MARTINS, A. S. Prevalence of equine herpesvirus type 1 latency detected by polymerase chain reaction. **Arch. Virol,** v. 145, p. 1773–1787, 2000.

DIAZ, K. A. F.; HÜBNER, S. D. O.; VARGAS, G.; FISCHER, G.; LILENBAUM, W.; DE LIMA, M. Ocorrência de anticorpos contra o herpesvírus equino e vírus da arterite equina em rebanhos equinos do estado do Rio de Janeiro. **Ciência Animal Brasileira,** v. 16, n. 3, p. 410-418, 2015.

DIEL, D. G.; et al. Prevalência de anticorpos contra os vírus da influenza, da arterite viral e herpesvírus em eqüinos do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural,** Santa Maria, v. 36, n. 5, p. 1467-1473, 2006.

FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. Herpesviridae. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas.** p. 433-488, 3ª ed., editora UFSM, Santa Maria, 2017.

GILKERSON, J. R.; BAILEY, K. E.; DIAZ-MENDEZ, A.; HARTLEY, C. A. Update on viral diseases of the equine respiratory tract. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.** v. 31, p. 91–104, 2015.

HUSSEY, G. S. Key Determinants in the Pathogenesis of Equine Herpesvirus 1 and 4 Infections. **Veterinary Pathology,** v. 56, n. 5, p. 656-659, 2019.

ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses. <https://talk.ictvonline.org>, 2019.

KAMEL M.; PAVULRAJ S.; OSTERRIEDER K.; e AZAB W. EHV-1 Pathogenesis: Current in vitro Models and Future Perspectives. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, p. 251, 2019.

NEGUSSIE, H.; GIZAW, D.; TESFAW, L.; LI, Y.; OGUMA, K.; SENTSUI, H.; NAUWYNCK, H. J. Detection of Equine Herpesvirus (EHV) -1, -2, -4 and -5 in Ethiopian Equids with and without Respiratory Problems and Genetic Characterization of EHV-2 and EHV-5 Strains. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 64, n. 6, p. 1970–1978, 2017.

OLADUNNI, F. S.; HOROHOV, D. W.; CHAMBERS, T. M. EHV-1: A Constant Threat to the Horse Industry. **Frontiers in Microbiology**, p.1-25, 2019.

PATEL, J. R.; HELDENS, J. Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4)–epidemiology, disease and immunoprophylaxis: a brief review. **The Veterinary Journal**, v.170, n.1, p.14-23, 2005.

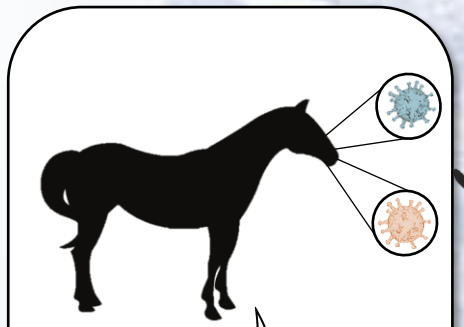
PUSTERLA, N.; MAPES, S.; WILSON, W. D. Prevalence of equine herpesvirus type 1 in trigeminal ganglia and submandibular lymph nodes of equids examined postmortem. **Vet. Rec.** v. 167, n. 10, p. 376-379, 2010.

WANG, L.; RAIDAL, S. L.; PIZZIRANI, A.; WILCOX, G. E. Detection of respiratory herpesvirus in foals and adult horses determined by nested multiplex PCR. **Vet Microbiol** v. 121, p. 18-28, 2007.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA
Graduação
PPGB Programa de Pós Graduação em Biotecnologia

DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DE *ALPHAHERPESVIRUS EQUIDEO* EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE EQUINOS DA REGIÃO SUL DO RIO GRANDE DO SUL

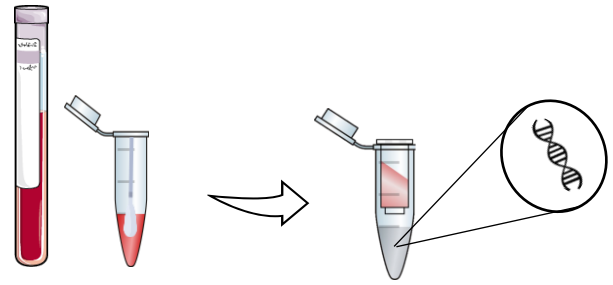
AMANDA DE OLIVEIRA BARBOSA[1]; TAMIRES ELLEN TOMIO[2]; LEONARDO CLASEN RIBEIRO[2];
ALICE SILVEIRA BECKER[3]; FRANCIELLE LIZ MONTEIRO[4]; MARCELO DE LIMA[5]



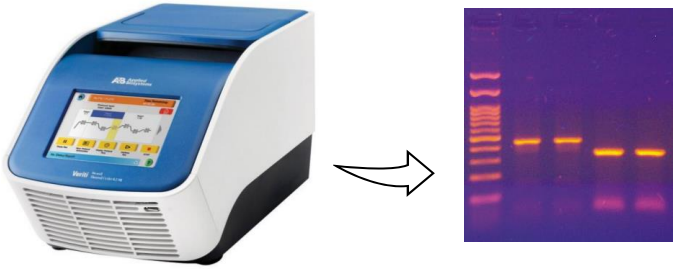
Animais infectados com EHV-1 e/ou EHV-4 têm perda na produtividade.



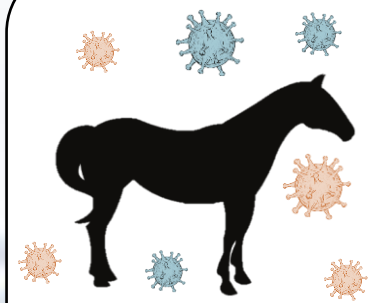
Coleta de sangue total (n=179) e secreção nasal (n=110).



Extração do material genético.



PCR semi-*nested* e eletroforese.



EHV- 1 11 amostras positivas.

EHV- 4 13 amostras positivas.

Fonte: arquivo pessoal, canva e google imagens.

EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM ANTÍGENO RECOMBINANTE DE *Clostridium chauvoei*

ANA VITÓRIA COSTA[1]; RAFAEL AMARAL DONASSOLO[1]; MARCOS ROBERTO ALVES FERREIRA[1]; MARILIANA LUIZA FERREIRA ALVES[1]; CLOVEIS MOREIRA JUNIOR[1]; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO[1]

[1]*Universidade Federal de Pelotas – costavitoria00@yahoo.com*

1. INTRODUÇÃO

Clostridium chauvoei é uma bactéria bacilar, Gram-positiva, com mobilidade mediada por flagelos peritríquios, estritamente anaeróbico, capaz de esporular, podendo ser encontrado no solo, no intestino e nos músculos de animais (LIMA, 1992; SATHISH & SWAMINATHAN, 2009). Este patógeno é responsável pelo carbúnculo sintomático, uma infecção endógena e aguda, que acomete diversas espécies de animais domésticos, dentre eles bovinos, caprinos, ovinos e búbalinos. Foram relatados casos de infecção por este microrganismo em humanos (NAGANO et al., 2008; WEATHERHEAD & TWEARDY, 2012). A doença ocorre pela proliferação da bactéria e a produção de toxinas nos tecidos, formando uma lesão local e toxemia. Os esporos produzidos são altamente resistentes, podendo permanecer em latência, o que dificulta a reversão da doença e aumenta a letalidade do carbúnculo sintomático, que pode chegar a 100% (GREGORY, et al., 2006). Visando o controle desta enfermidade, atualmente são impostas medidas adequadas de manejo e vacinação sistemática de todo o rebanho. No entanto, são poucos os trabalhos demonstrando a eficácia das vacinas nos animais. Além disso, estas formulações apresentam algumas desvantagens como risco biológico, necessidade de meios de cultura complexos, inativação e seleção das melhores cepas produtoras de antígenos. Diante disso, a produção de alvos vacinais através da tecnologia do DNA recombinante visa superar as limitações associadas à vacina comercializada, uma vez que estas possuem baixo risco aos manipuladores, boa imunogenicidade, processo de produção simples e maior direcionamento da resposta imune (DINIZ & FERREIRA, 2010). Assim, esse trabalho tem o objetivo de expressar e caracterizar um antígeno recombinante de *C. chauvoei* como possível alvo vacinal.

2. METODOLOGIA

Inicialmente, o gene que codifica um antígeno de *C. chauvoei* (CCX) foi fundido com dois adjuvantes moleculares (ADJ1 e ADJ2), sintetizados e clonados no vetor de expressão pLIA, gerando a molécula ADJ1-CCX-ADJ2. Posteriormente, *Escherichia coli* BL21 (DE3) Star foi transformada com vetor recombinante, por choque térmico. As bactérias foram cultivadas em caldo LB (37°C, 200 rpm) até atingir a densidade ótica (DO_{600}) 0,6-0,8, quando a expressão das proteínas recombinantes foi induzida com IPTG por 3 h, nas mesmas condições. As proteínas recombinantes foram caracterizadas conforme sua solubilidade e purificadas por cromatografia de afinidade por níquel. A análise da expressão, solubilidade e purificação foram avaliadas por eletroforese SDS-PAGE 12% e Western Blot (WB).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A construção e expressão da molécula de interesse foram eficazes, sendo visualizadas no tamanho de 49 KDa, conforme esperado, em SDS-PAGE 12% e WB. Ao analisar a solubilidade foi constatado que o antígeno foi expresso em corpo de inclusão. Conforme a figura 1, a purificação por cromatografia de afinidade ao níquel foi bem sucedida mostrando bandas aparentemente puras. A produção de uma vacina eficaz, segura e de baixo custo torna-se indispensável uma vez que o carbúnculo sintomático é uma doença letal dificilmente reversível e acomete diversos animais de produção, importante fonte de renda aos produtores. No ponto de vista brasileiro, a agropecuária corresponde a 20% do Produto Interno Bruto (PIB) e o Brasil é um dos maiores exportadores de carne bovina sendo assim, prejudicado por esta doença. Os bons resultados iniciais indicam a possibilidade do antígeno ADJ1-CCX-ADJ2 como alvo vacinal.

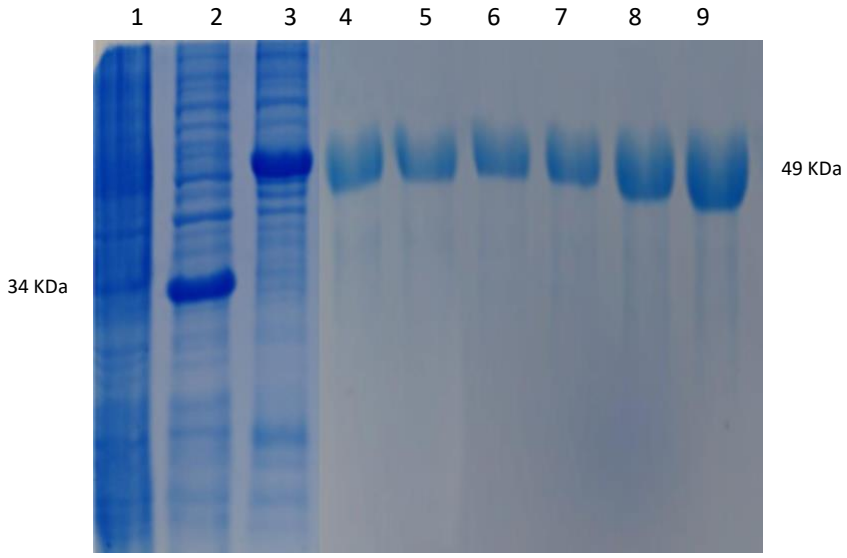


Figura 1. Análise da expressão da proteína por SDS-PAGE 12% corado com comassie blue. 1: *E. coli* Star C-; 2: CpB; 3: rCCX extrato 3 h; 4-9: eluições rCCX purificadas.



Figura 2. Análise da expressão da proteína por *Western Blot* com Mab anti-His6x revelado por DAB. 1: TaCs (55 KDa); 2: extrato *E.coli* rCCX; 3: rCCX purificada; 4: rCCX purificada e dialisada.

4. CONCLUSÕES

Os resultados indicam que a molécula produzida pode ser um bom alvo na produção de uma vacina recombinante contra o carbúnculo sintomático. No entanto, como pespectivas futuras, mais estudos são necessários visando

melhor caractetização da molécula incluindo testes de toxicidade, inocuidade e avaliação da resposta imune induzida por essa molécula em ruminantes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FREY, J.; JOHANSSON, A.; BÜRKI, I.; VILEI, E.M.; REDHEAD, K. Cytotoxin CctA, a major virulence factor of *Clostridium chauvoei* conferring protective immunity against myonecrosis. **Vaccine**, v.30, n.37, p. 5500-5505, 2012.

NEGANO, N.; ISOMINE, S.; KATO, H.; SASAKI, Y.; TAKAHASHI, M.; NEGANO, Y.; ARAKAWA, Y. Human fulminant gas gangrene caused by *Clostridium chauvoei.* **Clin Microbial**, v.46, n.4, p. 1545-1547, 2008.

WEATHERHEAD, J.E.; TWEARDY, D.J. Lethal human neutropenic entercolitis caused by *Clostridium chauvoei* in the United States: tip of the iceberg?. **Journal of Infection**, v.64, n.2, p. 225-227, 2012.

SATHISH, S.; SWAMINATHAN, K. Genetic diversity among toxigenic clostridia isolated from soil, water, meat and associated polluted sites in South India. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v.27, n.4, p. 311–320, 2009.

LIMA, F.G.F. Tipos de Colônia e Características Bioquímicas de Cultura de *Clostridium chauvoei* isoladas de Bovinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.12, n.3/4, p. 65-69, 1992.

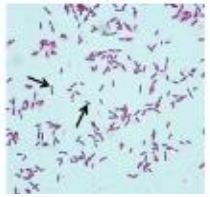
DINIZ, M.O.; FERREIRA, L.C.S. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. **Estudos avançados**, São Paulo, v. 24, n. 70, p. 19-30, 2010.

GREGORY, L., DELLA LIBERA, A.M.M., BIRGEL JUNIOR, E.H., POGLIANI, F.C., BIRGEL, D.B., BENESI, F.J., MIYASHIRO, S., BALDASSI, L. Carbúnculo sintomático: ocorrência, evolução clínica e acomoanhamento da recuperação de bovino acometido de ‘’manqueira’. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.2, p.243-246, 2006.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM ANTÍGENO RECOMBINANTE DE *Clostridium chauvoei*

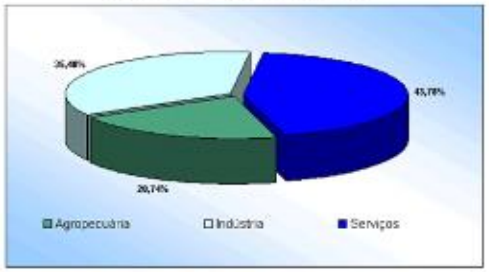
ANA VITÓRIA COSTA[1]; RAFAEL AMARAL DONASSOLO[2]; MARCOS ROBERTO ALVES FERREIRA[3]; MARILIANA LUIZA FERREIRA ALVES[4]; CLOVIS MEREIRA JUNIOR[5]; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO[6]



Clostridium chauvoei

- Bacilo Gram positivo;
- Encontrado no solo, no intestino e órgãos musculares de animais;
- Alta capacidade de virulência;
- Estritamente anaeróbico.

Agropecuária Brasileira



PIB = 20%

Carbúnculo sintomático



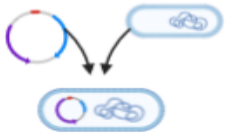
Produção de toxinas

Necrose do tecido muscular

Vacinas comerciais
X
Vacinas recombinantes



Construção da molécula de interesse



Transformação bacteriana



Cultivo dos recombinantes e indução da expressão



Lise celular e solubilização das proteínas



Purificação



SDS-PAGE e *Wersten Blot*

Resultados indicam que a molécula recombinante pode ser um potencial candidato vacinal.



ANÁLISE DA APLICAÇÃO DO USO DA OLEORRESINA EXTRAÍDA DO GÊNERO *COPAIFERA* COMO UM AGENTE ANTIBACTERIANO: UMA BREVE REVISÃO

ANNA CAROLINA BATISTA E SILVA[1]; MATHEUS MARINHO CAMPOS SIQUEIRA[2], JOSÉ ARION DA SILVA MOURA[3], ROMERO MARCOS PEDROSA BRANDÃO COSTA[4], ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO[5],THIAGO PAJEÚ NASCIMENTO[6]

[1]Universidade Federal Rural de Pernambuco – annacarolinabio23@gmail.com
[2]Universidade Federal de Pernambuco – matheus_tabira@hotmail.com
[3]Universidade Federal Rural de Pernambuco – arion-tomaz@outlook.com
[4]Universidade Federal Rural de Pernambuco – romero_brandao@yahoo.com.br
[5]Universidade Federal Rural de Pernambuco – analuporto@yahoo.com.br
[6]Universidade Federal Rural de Pernambuco – thiago_pajeu@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

As árvores de Copaibeiras fazem parte de um contexto histórico no Brasil, elas apresentam troncos cilíndricos com a presença de anéis circulares ao longo do seu tronco, tendo uma incidência maior na região Norte do país. Na região Amazônica o uso do óleo de copaíba é tão extenso, que a copaíba se destaca como a planta medicinal mais utilizada e conhecida pela população. O óleo pode ser encontrado em mercados populares e é conhecido por diferentes denominações, como: pau d'óleo, copaiba e bálsamo dos Jesuítas (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

As utilizações da medicina popular para o óleo de copaíba são muitas e indicam uma grande variedade de propriedades farmacológicas. As principais atividades relatadas foram de antiinflamatório das vias superiores e inferiores e cicatrizante (LEITE et al., 2002). Na indústria de fitoterápicos, o óleo de copaíba é utilizado para reumatismo, asma, úlcera estomacal, tratamento de micoses dermatológicas (LEITE et al., 2002).

O gênero *Copaifera* pertence à família *Fabaceae* e tem como uma de suas características a formação de oleorresina que é encontrado a parte da extração da árvore, sendo bastante utilizado para fins medicinais, com propriedades: anti-inflamatória, antifúngica (TOBOUT PL et al., 2017), antimicrobiana (DIEFENBACH AL, et al., 2018) podem também ser associados para o desenvolvimento de nanotecnologias para engenharia de tecidos.

O presente trabalho teve como objetivo relatar através de uma revisão de literatura a aplicação do uso da oleorresina extraída de plantas do gênero *Copaifera* como agentes antimicrobianos de ação bactericida e/ou bacteriostática frente a bactérias gram positvas e gram negativas com ação patogênica.

2. METODOLOGIA

Foi realizada uma revisão narrativa ao qual foram consultados artigos encontrados nas bases de dados ScienceDirect e Scopus, a pesquisa foi realizada a partir das palavras-chave: copaiba oil and antimicrobian activity. Sendo consultados artigos cientificos dos últimos 5 anos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A oleorresina de *Copaifera* é utilizada há mais de 390 anos, porém são poucas as publicações considerando suas atividades. A ação bactericida e bacteriostática da oleorresina frente a patógenos orais (*Streptococcus*, *Treponema*, *Fusobacterium*) foi verificada em análises *in vitro*, entretanto apenas um estudo mostrou que o efeito antimicrobiano foi semelhante à encontrada na clorexidina (considerada o padrão-ouro antimicrobiano) (DIEFENBACH AL, et al., 2017).

Dentre os trabalhos analisados foi visto que a maioria deles descreve a ação da atividade antibacteriana da oleorresina devido à combinação de sesquiterpenos e diterpenos em sua composição, afetando a integridade da parede celular bacteriana e promovendo a lise e posteriormente morte. As bactérias mais afetadas foram gram-postivas: *Staphylococcus* spp e *Streptococcus* spp embora, alguns trabalhos também relatam ação frente a gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa e Aggregatibacter* (TOBOUTI PL et al., 2017).

Por essa sua capacidade antimicrobiana muitos produtos já existem no mercado com a inclusão em sua formulação da oleorresina, por exemplo, óvulos para infecções ginecológicas e cremes vaginais.

4. CONCLUSÕES

Considerando a ação antimicrobiana da oleorresina apresentada, é comprovada que possui alto potencial de uso, seja frente a bactérias presentes em cavidades orais, ou para o tratamento de doenças bucais. Assim como a sua aplicação em diversos produtos de higiene inclusive íntima. Nesse sentido é interessante a busca por mais estudos que explorem a ação antimicrobiana em outros patógenos, além da aplicação biotecnológica da oleorresina.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DIEFENBACH, A. L., MUNIZ, F. W. M. G., OBALLE, H. J. R., & RÖSING, C. K. Antimicrobial activity of copaiba oil (*Copaifera* ssp.) on oral pathogens: Systematic review. **Phytotherapy Research**, 32(4), 586–596, 2017.

DIEFENCACH, AL, et al. Antimicrobial activity of copaiba oil (*Copaifera* ssp) on oral pathogens: Systematic review. **Phytotherapy Research**, 32(4), 2017.

LEITE, A.; ALECHANDRE, A.; RIGAMONTE-AZEVEDO, C.; CAMPOS, C. A.; OLIVEIRA, A. Recomendações para o manejo sustentável do óleo de copaíba, UFAC/SEFE: **Rio Branco**, 2002.

TOBOUTI, PL, et al. Antimicrobial activity of copaiba oil: A review and a call for further research. **Biomedicine & Pharmacotherapy**,94, 2017.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero *Copaífera* L. **Química Nova,**; 25: 273- 286, 2002.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

ANÁLISE DA APLICAÇÃO DO USO DA OLEORRESINA EXTRAÍDA DO GÊNERO *Copaifera* COMO UM AGENTE ANTIBACTERIANO: UMA BREVE REVISÃO

ANNA CAROLINA BATISTA E SILVA; MATHEUS MARINHO CAMPOS SIQUEIRA, JOSÉ ARION DA SILVA MOURA, ROMERO MARCOS PEDROSA BRANDÃO COSTA, ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO, THIAGO PAJEÚ NASCIMENTO



Árvores de copaiba
(*Copaifera langsdorffii*)



Oleorresinas de copaiba

Revisão de literatura da ação bactericida da oleorresina de *Copaifera* sp.

Staphylococcus spp
Streptococcus spp
Pseudomonas aeruginosa
Aggregatibacter



Streptococcus
Treponema
Fusobacterium



Óvulo



Creme vaginal

APLICAÇÃO DE PROBIÓTICOS EM DIFERENTES MATRIZES ALIMENTARES – UMA BREVE REVISÃO

BEATRIZ AIMI ISHIKAME[1]; GABRIELA DE QUADROS DA LUZ[2], MICHELE DUTRA ROSOLEN[3] , PATRICIA SILVA DIAZ [4]

[1]Universidade Federal de Pelotas – beatrizaimiishikame@gmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas – ql.gabi@gmail.com
[3]Universidade Federal de Pelotas – michele.dutra@gmail.com
[4]Universidade Federal de Pelotas – bilicadiaz@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A busca por um estilo de vida saudável de melhor qualidade e o aumento na expectativa de vida dos consumidores impulsionam cada vez mais o estudo e o desenvolvimento de alimentos funcionais, principalmente os enriquecidos com componentes fisiologicamente ativos, como os probióticos (ANNUNZIATA, 2013).

Conforme a definição proposta pela *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) e *World Health Oganizatio*n (WHO) em 2001, os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem algum benefício para a saúde. A utilização de probióticos tem sido muito importante para manutenção do equilíbrio no corpo humano, estimulando a proliferação de bactérias benéficas e ocasionando a diminuição de agentes pró-inflamatórios, conferindo assim inúmeros benefícios à saúde, tais como a melhora dos sintomas indesejáveis do trato gastrointestinal com por exemplo, na dor e distenções abdominais; melhora da resposta imune; prevenção de doenças, diretamente relacionadas ao trato gastrointestinal, como proporcionar o aumento de proteínas totais, diminuição do colesterol, melhora da absorção do cálcio em mulheres durante do o período de menopausa. (RANADHEERA 2010).

A manutenção da viabilidade das bactérias probióticas tem sido o alvo dos estudos atuais, visto que as bactérias não resistem a temperaturas extremas. Uma das principais formas de contornar esse problema tem sido o emprego da microencapsulação permitindo a sobrevivência das substâncias que em outras condições seriam degradadas. Um microrganismo é considerado probiótico se for habitante natural do trato gastrointestinal, sobreviver à passagem pelo estômago e mantiver a viabilidade e atividade no intestino (COOK et al., 2014). Além de aumentar a resistência e viabilidade dos microrganismos outras, vantagens têm sido agregadas à microencapsulação, como a utilização dos probióticos em matrizes não lácteas, como frutas, barra de cereais, produtos cárneos, vegetais, chocolates e diferentes tipos de sucos e bebidas (PRADO, 2008), abrangendo assim alérgicos, intolerantes à lactose e veganos.

Diante disso, o presente estudo visa fazer o levantamento de estudos recentes, onde há o emprego de microrganismos probióticos em diferentes matrizes alimentares, salientando assim, a possibilidade de desenvolvimento de novos produtos probióticos.

2. METODOLOGIA

Os conteúdos discutidos no presente trabalho foram levantados através de uma pesquisa bibliográfica, onde foram coletados artigos dos últimos cinco

anos com a temática “aplicação de microrganismos probióticos em diferentes matrizes alimentares”. Para esse levantamento foram utilizados periódicos publicados em algumas revistas nacionais e internacionais, quais sejam: *LWT - Food Science and Technology, Food Bioscience, Repositório Institucional da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (RIUT), Journal of Food Measurement and Characterization.*

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os alimentos probióticos lacteos têm sido associados por anos com a longevidade e bem-estar das pessoas, ocasionando diversos estudos com o intuito de salientar e investigar os benefícios e possibilidades atribuídas a esse acontecimento (FULLER, 1992). Diante desse embasamento, ROSS et al. (2002) evidenciaram o papel das propriedades presentes nos produtos lácteos que colaboram para a proteção e entrega do microrganismo probiótico viável no intestino do hospedeiro, tornando esta matriz o veículo ideal de entrega. Porém os produtos lacteos apresentam algumas limitações quanto à sua disponibilidade a todos os públicos, sendo eles incompatíveis com pessoas que apresentam intolerância a lactose e/ou tenha restrição a alguma outra propriedade presente no leite, ou ainda seja adepta ao veganismo (LAVERMICOCCA, 2006).

Diante disso, estudos dos últimos cinco anos têm demonstrado o interesse em ampliar a gama de produtos funcionais probióticos, com o emprego de técnicas de microencapsulação, com o intuito de promover proteção aos microrganismos nas diferentes matrizes alimentares utilizadas.

Dentro deste período, as bebidas não lácteas ganharam destaque, as quais estão sendo abordadas de duas formas, uma delas foi representada no estudo feito por DIAS et al. (2018), onde o objetivo do trabalho foi desenvolver suco probiótico de maracujá, para isso utilizaram a cepa *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12 aplicada em suco de maracujá, usando maldotextrina e/ou inulina como material encapsulante para a técnica de *spray drying.* Foram realizadas análises físico-químicas e a contagem de células viáveis durante o armazenamento por 30 dias, onde a microcapsula confeccionada com inulina ofertou maior proteção e menor alteração das propriedades físico-químicas do suco, tornando-se promissora para o desenvolvimento de suco de maracujá probiótico.

Outra abordagem de bebidas probióticas não lácteas foi estudada por CARVALHO et al. (2018), no qual foi desenvolvido microcápsulas probióticas pela técnica de *spray drying* contendo a cepa *Lactobacillus acidophilus* La-5 e utilizando dextrina tartarato de mandioca como material encapsulante. Após o processo de secagem, os autores submeteram a microcapsula probiótica às analises morfológicas e físico-químicas, onde foi salientado a estabilidade e proteção das cápsulas, as quais foram posteriormente aplicadas em preparado sólido para refresco sabor laranja e armazenadas por 45 dias. Durante este período a amostra contendo as microcápsulas probióticas demonstraram características visuais e solubilidade similares ao tratamento controle, além da viabilidade celular do microrganismo probioticos, apresentando dessa forma, a possibilidade de aplicação de microcápsulas em matrizes alimentares previamente preparadas. HAFFNER e PASC (2018) liofilizaram a cepa *Lactobacillus. rhamnosus* GG (LGG) acompanhada de alginato ou sílica e aplicaram as capsulas em suco de maça e cerveja, os quais foram

armazenados a 4°C e avaliados quanto a características físico-químicas e viabilidade celular. Os resultados demonstraram que a capsula probiótica feita com alginato foi capaz de promover uma menor perda de viabilidade celular quando aplicada no suco de maça quando comparada com a aplicação na cerveja no final de sete dias. Enquanto a capsula probiótica contendo sílica promoveu uma melhor proteção do microrganismo probiótico na cerveja durante o mesmo período.

Além das bebidas probióticas não lácteas, estudos tem demonstrado a aplicação de probióticos encapsulados e aplicados em alimentos sólidos, aumentando ainda mais a gama de produtos probióticos. A fim de expandir seus campos de mercado e a aceitação em uma faixa etária mais ampla, MUZZAFAR e SHARMA em 2018, testaram a viabilidade de incorporação de probióticos em produtos secos, como em biscoitos recheados, o desafio foi proteger as células probióticas em alimentos geralmente não consideradas como seu veículo, como produtos de cereais. Exemplos que foram usados como base foi a desenvolvimento de frutos secos enriquecidos com probióticos por impregnação à vácuo por BETORET ET AL.; KRASAEKOOPT E SUTHANWONG, onde combinaram os efeitos benéficos dos probióticos com frutas e vegetais.

Nesse estudo foram utilizadas três cepas, *Lactobacillus acidophilus* (NCDC 11), *Lactobacillus rhamnosus* (NCDC 17), *Bifidobacterium bifidum* (NCDC 236). Foi preparado um creme para compor o recheio do biscoito, o qual foi incorporado os microrganismos. Foram testados como materiais de base para microencapsulação: A mistura que compreende goma de guar, inulina, Dextrose, óleo de girassol e Tween 80; e a mistura que compreende goma xantana, maltodextrina, sacarose, óleo de girassol e Tween 80. Para testar a viabilidade do biscoito foram feitos testes para avaliar a resistência ao baixo pH e a capacidade de tolerância dos microrganismos probioticos para alta a concentração de bile. O estudo mostrou o biscoito como uma matriz aceitável para incorporação de probióticos, mostrando tolerância aos sais biliares e ao baixo ph. Os materiais de parede de microencapsulação composto de goma guar e goma xantana se mostraram muito eficazes para a fabricação e manutenção do alto número de microcápsulas probióticas secas viáveis. Porém avaliando os parâmetros físicos e a viabilidade das células é necessário a melhora dos resultados para além de 8 semanas para suprir a necessidades do mercado que exige mais tempo de viabilidade.

Na pesquisa de RUSU et al. (2017) foi estudada a possibilidade da obtenção de probióticos na forma de pó, o qual foi implementado em uma sobremesa vegana. No estudo, o probiótico selecionado foi o *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, as células probióticas foram microencapsuladas pela técnica de *spray drying*, onde foi utilizado alginato de sódio e caseína como material encapsulante. As microcápsulas foram submetidas a testes para avaliar sua eficácia durante o processo gastrointestinal e para determinar a viabilidade celular. Devido aos baixos níveis de água do pó, notou-se um aumento no tempo de armazenamento e a viabilidade se manteve praticamente constante durante 5 meses de estocagem.

De acordo com o estudo de SILVA (2016), o chocolate amargo além do potencial para um novo alimento funcional, devido seu caráter antioxidante, também tem se mostrado como uma opção de matriz carreadora para o

Lactobacillus acidophilus LA3 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1 nas formas livres e encapsuladas. Foram feitos testes para verificar a influência da quantidade de chocolate e probióticos, a viabilidade das células durante a estocagem e armazenamento, testes *in vitro* simulando o sistema gastrointestinal, e também as características físico-químicas. As cepas liofilizadas de *Lactobacillus acidophilus* LA3 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1 foram incorporadas ao caldo MRS e microencapsulados pela técnica de *spray chilling* e interação eletrostática, ambas foram eficazes para proteção do microrganismo, porém o resultado de células viáveis foi maior na técnica de *spray chilling*. Durante o teste de viabilidade na estocagem e armazenamento foi possível notar a viabilidade dos probióticos por 120 dias a 25ºC, mostrando que o chocolate amargo é uma excelente opção de matriz carreadora.

4. CONCLUSÕES

Diante dos estudos levantados no período de 2015-2020, foi demonstrado o interesse dos pesquisadores em apresentar novas conformações de produtos probióticos, mostrando dessa forma, a possibilidade de ampliação de produtos funcionais contendo probióticos no mercado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANNUNZIATA, A., & VECCHIO, R. Functional foods development in the European market: A consumer perspective. **Journal of Functional Foods**, 3(3), 223–228. 2011 doi:10.1016/j.jff.2011.03.011

BETORET, N., PUENTE, L., DIAZ, M.J. , PAGÁN, M.J., GARCIA, M.J. . GRAS, M.L. , MARTÍNEZ-MONZÓ,J., FITO, P. Development of probioticenriched dried fruits by vacuum impregnation. **J. Food Eng**. 56, 273–277. 2003

CARVALHO, K. **Microencapsulação de Lactobacillus acidophilus La-5 com dextrina de mandioca como agente encapsulante e aplicação na formulação de preparado sólido para refresco**. 2018. 80 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2018.

COOK, Michael T., TZORTZIS, George., CHARALAMPOPOULOS, Dimitris., KHUTORYANSKIY, Vitaliy V. Microencapsulation of a synbiotic into PLGA/alginate multiparticulate gels. **International Journal of Pharmaceutics**, 466(1-2), 400–408. 2014. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.03.034

DIAS, C. O., DOS SANTOS OPUSKI DE ALMEIDA, J., PINTO, S. S., DE OLIVEIRA SANTANA, F. C., VERRUCK, S., MÜLLER, C. M. O,.. M. C. A., R. D. Development and physico-chemical characterization of microencapsulated bifidobacteria in passion fruit juice: A functional non-dairy product for probiotic delivery. **Food Bioscience**, 24, 26–36. 2018. doi:10.1016/j.fbio.2018.05.006

FAO/WHO. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food.** Report of a Joint FAO/ WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada: Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization, Honduras. 2002.

FULLER, R. **Probiotics, The Scientific Basis**. First edition. United Kingdom, 1992. doi:10.1007/978-94-011-2364-8

HAFFNER, F. B., & PASC, A. Freeze-dried alginate-silica microparticles as carriers of probiotic bacteria in apple juice and beer. LWT, 91, 175–179. 2018 .doi:10.1016/j.lwt.2018.01.050

KRASAEKOOPT, W., SUTHANWONG, B. Vacuum impregnation of probiotics in fruit pieces and their survival during refrigerated storage. Kasetsart J. 42, 723–731. 2008.

LAVERMICOCCA, . Highlights on new food research. **Digestive and Liver Disease**, 38, S295–S299. 2006. doi:10.1016/s1590-8658(07)60014-0

Muzzafar, A., & Sharma, V. Microencapsulation of probiotics for incorporation in cream biscuits. **Journal of Food Measurement and Characterization**, 12(3), 2193–2201. 2018. doi:10.1007/s11694-018-9835-z

PRADO, Flávera C., PARADA, Jose L., PANDEY, Ashok., SOCCOL, Carlos R. Trends in non-dairy probiotic beverages. **Food Research International**, 41(2), 111–123. 2008. doi:10.1016/j.foodres.2007.10.010

RANADHEERA, R. D. C. S., BAINES, S. K., ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, 43(1), 1–7. 2010. doi:10.1016/j.foodres.2009.09.009

ROSS, R. P., FITZGERALD, G. F., COLLINS, J. K., & STANTON, C. Cheese delivering biocultures-probiotic cheese. **The Australian Journal of Dairy Technology**, 57(2), 71–78. 2002.

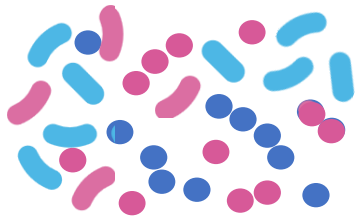
RUSU, B., BINDEA, M., CĂLINOIU, L. F., PRECUP, G., MITREA, L., ŞTEFĂNESCU2 B. E., VODNAR, D. C., Microencapsulated Probiotics With Food Applicability. **USAMV**. 2017.

SILVA, M. P. **Desenvolvimento e caracterização de chocolate meio amargo contenco micro-organismos probióticos na forma livre e encapsulada**. 2016. 126f. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-graduação em engenharia de Alimentos) Faculdade de Zootecnia e Engenharia de alimentos, Universidade de São Paulo.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

APLICAÇÃO DE PROBIÓTICOS EM DIFERENTES MATRIZES ALIMENTARES – UMA BREVE REVISÃO

BEATRIZ AIMI ISHIKAME[1]; GABRIELA DE QUADROS DA LUZ[2], MICHELE DUTRA ROSOLEN[3] , PATRICIA SILVA DIAZ [4]



Microrganismos probióticos



Intolerantes a componentes do leite e veganos



Sobremesa vegana probiótica (Rusu et al, 2017)



Chocolate amargo probiótico (Silva, 2016)



Suco de maracujá probiótico (Dias et al, 2018)



Atuais fontes alimentares de probióticos

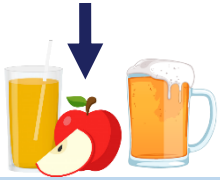


Efeitos benéficos na microbiota intestinal

Pesquisas recentes com o interesse de ampliar a gama de produtos probióticos no mercado



Biscoito recheado probiótico (Muzzafar e Sharma, 2018)



Suco de maça e cerveja probióticos (Haffner e Pasc, 2018)



Suco de laranja em pó probiótico (Carvalho et al, 2018)

AUMENTO DA PRODUÇÃO DE FENAZINA-1-ÁCIDO-CARBOXÍLICO EM *E. COLI*: EFEITOS DA SUPEREXPRESSÃO DOS GENES TKTA E PPSA

DANIEL LOSSA ALTMANN[1]; ADILSON JOSÉ DA SILVA[2]

[1]Universidade Federal de São Carlos – altmannlossa@gmail.com
[2] Universidade Federal de São Carlos– adilsonjs@ufscar.br

1. INTRODUÇÃO

Metabólitos secundários conhecidos como fenazinas são compostos aromáticos nitrogenados produzidos em especial por bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Streptomyces* (LAURSEN; NIELSEN, 2004). Devido a suas características biológicas e propriedades redox, essas têm sido empregadas em diferentes áreas da biotecnologia, como por exemplo, no controle biológico de pragas, e na construção de dispositivos eletroquímicos e biossensores (CHINCHOLKAR; THOMASHOW, 2013; PIERSON L.; PIERSON E., 2010). Apesar de existirem rotas químicas para sua produção, tais processos apresentam altos custos e baixa produtividade (CHELUVAPPA, 2014). Dessa forma, o uso de microrganismos tem se mostrado como uma alternativa para síntese em maiores escalas. Como exemplo, a fenazina-1-ácido carboxílico (PCA), precursora chave de outras fenazinas e produto de interesse neste trabalho, tem sido produzida na linhagem geneticamente modificada de *Pseudomonas aeruginosa* M18. A molécula se destaca por atividades antifúngicas e antibacterianas, sendo registrada como princípio ativo do biopesticida "*Shenquimicyn*" (CEZAIRLIYAN et al., 2013; HU et al, 2005). Sua biossíntese e das demais fenazinas é realizada a partir do corismato, que é o produto final da via do chiquimato, por meio do cluster gênico *phzABCDEFG,* proveniente de *P. aeruginosa* (CHINCHOLKAR; THOMASHOW, 2013).

Atualmente, existem diferentes estudos de otimização para produção de PCA voltados a organismos naturalmente produtores que, no entanto, são patogênicos e de baixa produtividade (PIERSON L.; PIERSON E., 2010). Por outro lado, muitos alvos para aumento da biossíntese de compostos aromáticos, derivados da via do chiquimato, encontram-se reportados em literatura (HUCCETOGULLARI et al., 2019), mas ainda não foram explorados na produção de fenazinas.

Neste trabalho, propomos a superexpressão de dois desses alvos, as enzimas TktA e PpsA, em uma linhagem não patogênica de *Escherichia coli* carregando o operon *phz* para produção heteróloga de PCA. As enzimas-alvo atuam na formação dos precursores iniciais da via do chiquimato e, por meio da superexpressão individual e em conjunto das enzimas, visamos avaliar o efeito das mesmas na síntese heteróloga de PCA.

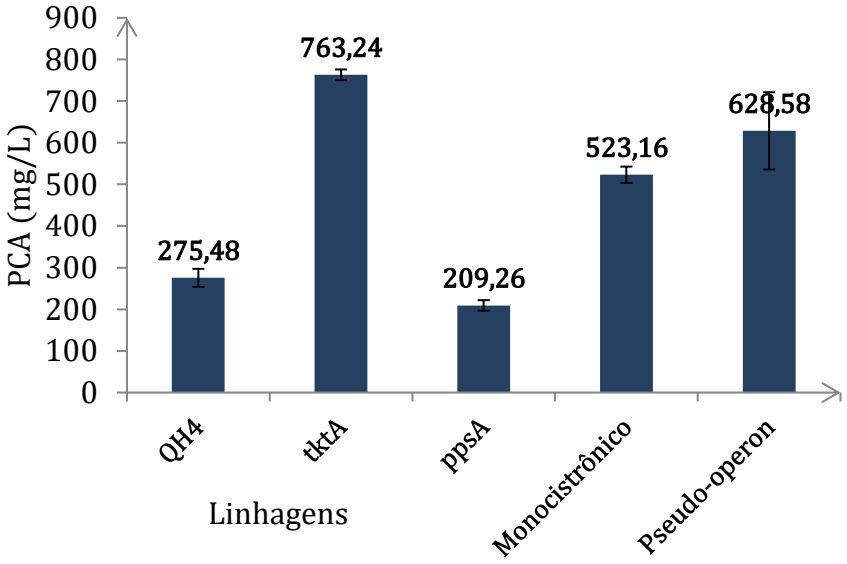
2. METODOLOGIA

Os genes *tktA* e *ppsA* foram clonados individualmente e em conjunto no plasmídeo pRSM4 e transformados em células parentais de *E. coli* QH4, linhagem com deleções Δ*tyrA*, Δ*pheA* (HUANG et al., 2013), com o plasmídeo pETM7*_phzABGFCDE* (genes clonados *de P. aeruginosa* para síntese de PCA). Os plasmídeos utilizados são derivados da série *ePathBrick vectors* (XU et al., 2012) após a substituição do promotor T7 pelo promotor lacUV5. Na configuração monocistrônica (pRSM4*_tktA_ppsA*) cada gene é precedido pelo promotor e seguido por um terminador, e na configuração de pseudo-operon (pRSM4*_ppsA_tktA*) cada gene é precedido pelo promotor, mas ambos compartilham o mesmo terminador. As duas configurações foram construídas para combinação dos genes no vetor. O cultivo em duplicata das linhagens em comparação com a parental foi realizado em erlenmeyers, meio TB + 2% glicerol, 30º C, 220 rpm, com indução por IPTG 1 mM. Quantificou-se glicerol e PCA por HPLC (KERN; NEWMAN, 2014) e biomassa por leitura de absorbância a 600 nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com exceção da linhagem com *ppsA* superexpresso individualmente, todas as outras apresentaram produção superior à parental (QH4), como pode ser observado na figura 1.

Figura 1: Concentração máxima de PCA atingida por cada linhagem



Foram obtidas a concentração máxima de biomassa, velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}), o fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$) e produtividade volumétrica (P_p) para cada uma das linhagens, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados de produtividade e crescimento celular

Linhagem	Biomassa (g/L)	$\mu_{max}(h^{-1})$	$Y_{p/s}$ (mg/g)	P_p $(mg/L.h)$
QH4	14,9	0.67	12,9	9,8
tktA	13,1	0,62	35,1	25,5
ppsA	10,2	0,56	7,9	8,9
Monocistrônico	14,8	0,55	24,0	16,6
Pseudo-operon	14,9	0,52	24,2	19,1

A superexpressão de PpsA prejudicou a produtividade e crescimento celular, visto que no grupo com a enzima codificada individualmente, foi observada a redução em todos os parâmetros analisados, em relação à parental. Devido a isso, as maiores concentrações de PCA apresentadas pelas linhagens monocistrônica e pseudo-operon (em relação à parental) foram justificadas pela presença de TktA. Uma possível sobrecarga metabólica gerada pela síntese proteica de PpsA pode estar relacionada com os resultados observados. Para a linhagem com TktA superexpresso individualmente, os valores de biomassa e μ_{max} foram próximos aos atingidos pela parental, mostrando que a modificação não prejudicou o crescimento celular. A linhagem gerou alto impacto na produção da molécula alvo, com concentração 178% maior em relação à parental. Por fim, seus valores de $Y_{p/s}$ e P_p calculados evidenciaram um grande aproveitamento do substrato direcionado à síntese de PCA. Tal observação foi justificada frente às reações da enzima TktA, associadas a um melhor aproveitamento de intermediários glicolíticos via formação de eritrose-4-fosfato (E4P), precursor da via do chiquimato.

4. CONCLUSÕES

A superexpressão de TktA, envolvido na disponibilização de E4P, precursor da via do chiquimato, levou a um grande aumento na produção de PCA em *E. coli,* sem prejudicar seu crescimento. Já a superexpressão de PpsA diminuiu a concentração da molécula alvo e prejudicou o crescimento das células. Novos alvos de superexpressão, deleção e modificações enzimáticas estão sendo estudados na tentativa de se obter maiores incrementos na produção de PCA.

Agradecimento à FAPESP, ao Departamento de Engenharia Química da UFSCar, ao Laboratório de Fábricas Celulares (LaFaC) e ao MSc. Josivan Cunha, responsável pelas análises de HPLC.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHINCHOLKAR, S., THOMASHOW, L. **Microbial phenazines: Biosynthesis, Agriculture and Health**. Nova York: Springer, 2013.PIERSON, L.S., PIERSON, E.A. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Nova York, v. 86, n.6, p. 1659–1670, 2010.

LAURSEN J. B., NIELSEN J. Phenazine Natural Products: Biosynthesis, Synthetic Analogues, and Biological Activity.**Chemical Reviews**, Washington, v. 104, n3, p. 1663-1686, 2004.

CHELUVAPPA R. Standardized chemical synthesis of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin. **MethodsX**, v. 1, p. 67-73, 2014.

CEZAIRLIYAN, B., VINAYAVEKHIN, N., GRENFELL-LEE, D., et al. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* phenazines that kill caenorhabditis elegans. **PLoS Pathogens**, California, v. 1, n. 9, 2013.

HU, H.B., XU, Y.Q., CHEN, F., et al. Isolation and characterization of a new fluorescent 558 *Pseudomonas* strain that produces both phenazine 1-carboxylic acid and pyoluteorin. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Yuseong-gu, v. 15, n. 1, p. 86-90, 2005.

HUCCETOGULLARI, D., LUO, Z.W., LEE, S.Y., 2019. Metabolic engineering of microorganisms for production of aromatic compounds. **Microbial Cell Factories**, California, v. 18, n. 41, p. 1-29, 2019.

HUANG, Q., LIN, Y., YAN, Y. Caffeic acid production enhancement by engineering a phenylalanine over-producing *Escherichia coli* strain. **Biotechnology and Bioengineering**, V. 110, n. 12, p. 3188–3196, 2013.

XU, P., VANSIRI, A., BHAN, N., KOFFAS, M.A.G. ePathBrick: A Synthetic Biology Platform for Engineering Metabolic Pathways in *E. coli*. **ACS Synthetic Biology**, Washington, v. 1, n. 7, p. 256– 266, 2012.

KERN S. E., NEWMAN D. K. Measurement of Phenazines in Bacterial Cultures. In: Filloux A., RAMOS J. L. (eds.). **Pseudomonas Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**. Nova York: Springer, 2014. 25, p 303-310.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

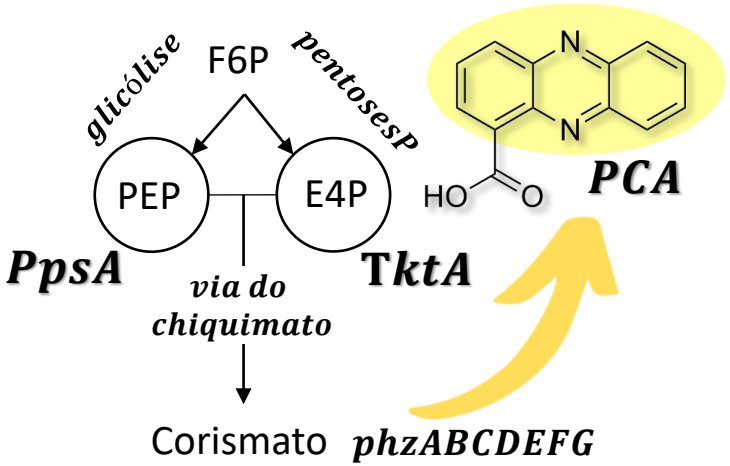
AUMENTO DA PRODUÇÃO DE FENAZINA-1-ÁCIDO-CARBOXÍLICO EM *E. COLI*: EFEITOS DA SUPEREXPRESSÃO DOS GENES TKTA E PPSA

DANIEL LOSSA ALTMANN[1]; ADILSON JOSÉ DA SILVA[2]

FENAZINAS

Ação Antifúngica e antimicrobiana: Princípio ativo do biopesticida "*Shenquimicyn*"; Síntese química **Inviável;** Bioprocesso atual em organismo **patogênico** de **baixa produtividade**

Biossíntese



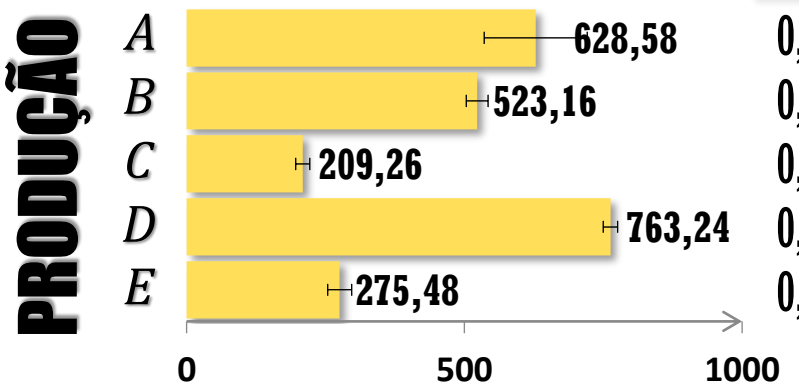


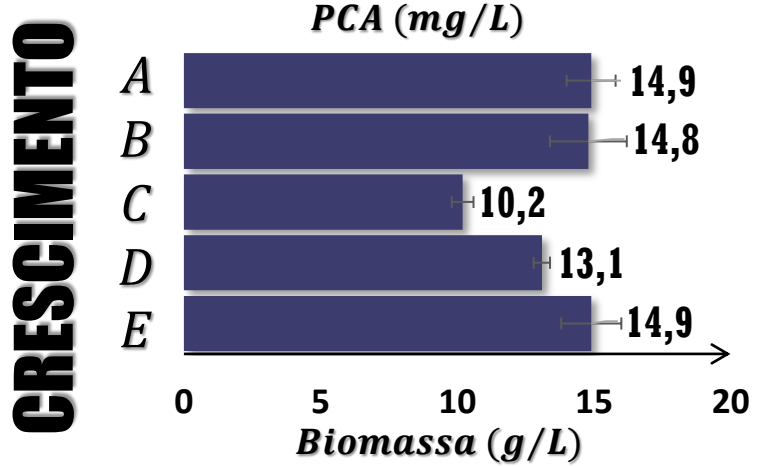
Linhagens de *E. coli* Cultivadas

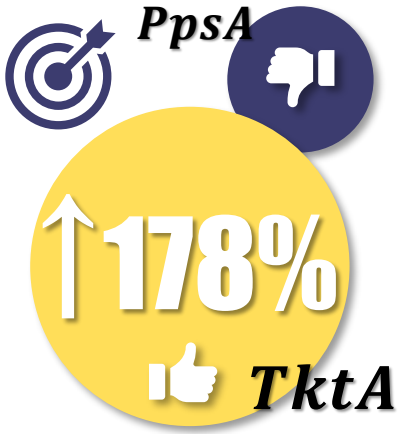


- ***A*** PpsA+TktA
- ***B*** Tkta + PpsA
- ***C*** PpsA
- ***D*** TktA
- ***E*** Parental

	μ_{max} (h^{-1})	$Y_{p/s}$ (mg/g)	P_p $(mg/L.h)$
A	0,52	24,2	19,1
B	0,55	24,0	16,6
C	0,56	07,9	08,9
D	0,62	35,1	25,5
E	0,67	12,9	09,8







POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO CARVACROL *IN VITRO* CONTRA *Acinetobacter baumannii* MULTIRRESISTENTE

DÉBORAH TROTA FARIAS DE ALBERNAZ[1]; KAMILA FURTADO DA CUNHA[2]; SUZANE OLACHEA ALLEND[3]; MARCELLE OLIVEIRA GARCIA[4]; DAIANE DRAWANZ HARTWIG[5]

[1]*Universidade Federal de Pelotas – trotadeborah@gmail.com*
[2]*Universidade Federal de Pelotas – kamilafurtado1@hotmail.com*
[3]*Universidade Federal de Pelotas – suzane_olachea@yahoo.com.br*
[4]*Universidade Federal de Pelotas – marcelle_garcia@hotmail.com*
[5]*Universidade Federal de Pelotas – daianehartwig@gmail.coml*

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, surtos de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) associados à *Acinetobacter baumannii* têm sido relatados no mundo todo. *A. baumannii* é um patógeno oportunista encontrado em ambiente hospitalar, afetando principalmente pacientes imunocomprometidos em unidades de terapia intensiva (UTIs) (WIELAND, 2018; ALMASAUDI, 2018). São associados a infecções nas vias respiratórias, ferimentos e trato urinário e, frequentemente, causam quadros de septicemia (MURRAY, 2017). Além disso, a resistência à múltiplas drogas (RMD) nessa espécie representa um problema de saúde pública, uma vez que na atualidade ela mostra-se pan-resistente, ou seja, resistente a todos os antimicrobianos disponíveis, esgotando as opções terapêuticas (LEE, 2017).

Nesse contexto, os produtos obtidos a partir das plantas, principalmente os óleos essenciais (OE), têm demonstrado efetividade em diversos estudos pela busca e desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas (DJIHANE, 2017; SEMENIUC, 2017). Os OE são oriundos do metabolismo secundário das plantas e tem sua atividade antimicrobiana atribuída principalmente aos terpenóides presentes em sua composição. Devido as variações ocorridas em sua composição, ocasionadas de acordo com a temperatura, sazonalidade, entre outras influências, substâncias isoladas podem agir como uma alternativa para contornar esses problemas (AMARAL, 2015).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação do carvacrol, uma substância fenólica presente em espécies das famílias Lamiaceae, como no orégano (*Origanum vulgare* L.) e no tomilho (*Thymus vulgaris* L.), frente à cepa padrão ATCC19606 e isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii*.

2. METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular de Micro-organismos, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas. Foram testados três isolados multirresistentes de *A. baumannii* (Ab2, Ab15 e Ab47) e a cepa padrão ATCC19606. O carvacrol (Sigma-Aldrich®) utilizado neste estudo foi preparado em uma solução estoque na concentração de 224 $mg.mL^{-1}$ em caldo BHI (*Brain Heart Infusion* – Kasvi®), acrescido de Tween 80 (Sigma-Aldrich®) à 1%.

Os inóculos bacterianos foram preparados a partir da suspensão de culturas recentes (18-24h) em solução salina (0,9%), sendo sua concentração ajustada a 10^4 UFC.mL^{-1} para realização dos testes. A Concentração Mínima Inibitória (CMI) foi determinada através da técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2020). Foram feitas diluições de razão dois da solução estoque de carvacrol em caldo Muller-Hinton (MH) (Kasvi®) acrescido de Tween 80 (Sigma-Aldrich®) 1% variando as concentrações de 0,109 à 56 mg.mL^{-1}, em seguida foram adicionados 50 µL do inóculo bacteriano e as placas incubadas a 37°C por 24h. Foram utilizados como controles somente o meio de cultivo (negativo), meio de cultivo acrescido do inóculo (positivo) e ainda um controle de esterilidade do carvacrol. Após o período de incubação, foram adicionados 10 µL de Resazurina 0,02% (Sigma-Aldrich®) em todos os poços, no qual o surgimento da coloração rosa indicou possível viabilidade celular bacteriana. O sendo os testes realizados em triplicata.

A determinação da Concentração Mínima Bactericida (CMB) foi realizada a partir dos resultados da CMI, onde foi coletada uma alíquota dos poços que apresentaram inibição do crescimento bacteriano e inoculada em placas contendo Ágar MH. As placas foram incubadas à 37ºC por 24h, para avaliar se as concentrações se demonstraram bacteriostáticas ou bactericidas.

O ensaio de tempo de morte (*Time-kill*) foi realizado através da contagem de células viáveis, de acordo com a metodologia proposta por Daniel-Jambun et al. (2019). O composto foi testado em quatro concentrações distintas, sendo elas: 1/4xCMI, 1/2xCMI, 1xCMI e 2xCMI. Os inóculos bacterianos foram submetidos a essas concentrações e foram realizadas contagens nos tempos 0h, 1min, 10min, 20min, 30min, 1h, 2h, 4h, 8h e 24h, sendo semeadas por gota em Ágar MacConkey (Kasvi®), seguido de incubação à 37°C por 24h. Uma cultura bacteriana sem a adição do carvacrol foi utilizada como controle do crescimento bacteriano.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontrados na determinação da CMI e CMB do carvacrol podem ser visualizados na Tabela 1. É possível observar que foram obtidos os mesmos resultados para os três isolados clínicos e para a ATCC19606 de *A. baumannii*, sendo a CMI de 1,75 mg.mL^{-1}, enquanto a CMB foi de 3,5 mg.mL^{-1}.

Tabela 1. Resultados da CMI e CMB para os isolados e a ATCC 19606 de *A. baumannii*.

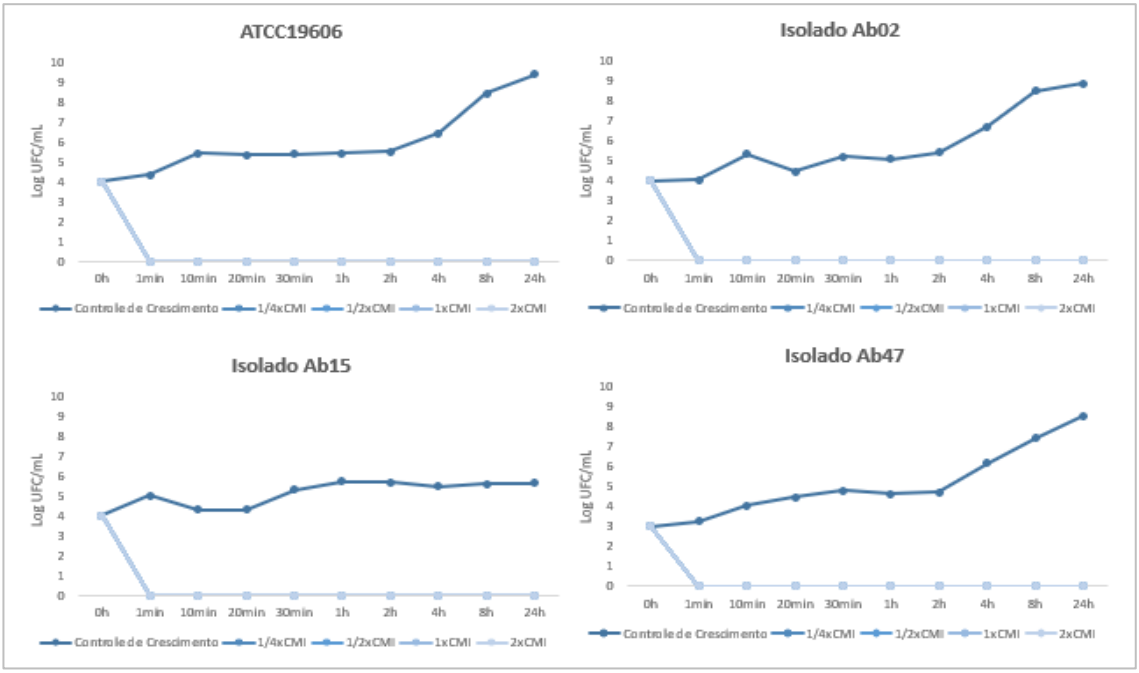
A. baumannii	**CMI (mg.mL^{-1})**	**CMB (mg.mL^{-1})**
ATCC 19606	1,75	3,5
Isolado Ab02	1,75	3,5
Isolado Ab15	1,75	3,5
Isolado Ab47	1,75	3,5

MONTAGU et al. (2016), avaliando a ação *in vitro* do carvacrol (Sigma-Aldrich®) frente a cepa padrão ATCCBAA-1710 de *A. baumannii*, encontraram resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo, com valores de CMI de 0,16 mg.mL^{-1}. HASSANNEJAD et al. (2019), em seus estudos com carvacrol, obtiveram CMI nas concentrações 0,04 mg.mL^{-1} e 0,025 mg.mL^{-1},

para isolados clínicos e a mesma cepa padrão de *A. baumannii* utilizada em nosso estudo, respectivamente.

Com relação ao ensaio de tempo de morte, os resultados estão demonstrados na Figura 1. Observou-se que o carvacrol matou todas as cepas bacterianas testadas a partir do início do tratamento, em todas as concentrações avaliadas.

Figura 1. Avaliação do tempo de morte de cepa padrão e isolados clínicos multirresistentes de *A. baumannii*, frente a diferentes concentrações de carvacrol.



Diferente do nosso estudo, MONTAGU et al. (2016) não encontraram ação bactericida para o carvacrol no ensaio de tempo de morte utilizando a concentração de 0,21 mg.mL^{-1} para a ATCCBAA-1770 de *A. baumannii*, apesar disso, observou ação bacteriostática após 6h.

Segundo KACHUR et al. (2019), a ação bactericida do carvacrol decorre da hidrofobicidade que compostos aromáticos apresentam. Devido à sua lipofilia elevada, o carvacrol se insere nas membranas das bactérias causando alterações em suas propriedades físico-químicas, podendo acarretar em sua destruição. Dessa forma, o carvacrol demonstra um bom potencial *in vitro* contra isolados multirresistentes de *A. baumannii*, podendo ser uma fonte para futuras explorações farmacológicas, a fim de minimizar o impacto que esses micro-organismos RMD causam na saúde pública.

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, foi possível observar que o carvacrol demonstrou atividade bacteriostática e bactericida *in vitro*, frente a cepa padrão e isolados clínicos multirresistentes de *A. baumannii*, nas concentrações de 1,75 e 3,5 mg.mL^{-1}, respectivamente. Contudo, apesar

dos resultados serem animadores, considera-se importante a realização de mais testes a fim de comprovar a eficácia do composto e sua exploração como alternativa antibiótica contra micro-organismos multirresistentes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

WIELAND, Katja; CHHATWAL, Patrick; VONBERG, Ralf-Peter. Nosocomial outbreaks caused by Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa: Results of a systematic review. **American journal of infection control**, v. 46, n. 6, p. 643-648, 2018.

ALMASAUDI, Saad B. Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. **Saudi journal of biological sciences**, v. 25, n. 3, p. 586-596, 2018.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michel A. **Microbiologia Médica**. 8° edição, Rio de Janeiro: Elsevier, 2017. 848 p.

LEE, Chang-Ro et al. Biology of Acinetobacter baumannii: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 55, 2017.

DJIHANE, Bouzid et al. Chemical constituents of Helichrysum italicum (Roth) G. Don essential oil and their antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, filamentous fungi and Candida albicans. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, n. 5, p. 780-787, 2017.

SEMENIUC, Cristina Anamaria; POP, Carmen Rodica; ROTAR, Ancuţa Mihaela. Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **journal of food and drug analysis**, v. 25, n. 2, p. 403-408, 2017.

AMARAL, Lúcio de Paula et al. Seasonal influence on the essential oil production of Nectandra megapotamica (Spreng.) Mez. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 1, p. 12-21, 2015.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.

DANIEL-JAMBUN, D.; ONG, K. S.; LIM, Y. Y.; TAN, J. B. L.; YAP, S. W.; LEE, S. M. Bactericidal and cytotoxic activity of a diarylheptanoid (etlingerin) isolated from ginger (*Etlingera pubescens*) endemic to Borneo. **Journal of Applied Microbiology**, Accepted Articles, 2019.

MONTAGU, Angélique et al. Stress conditions induced by Carvacrol and Cinnamaldehyde on Acinetobacter baumannii. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1133, 2016.

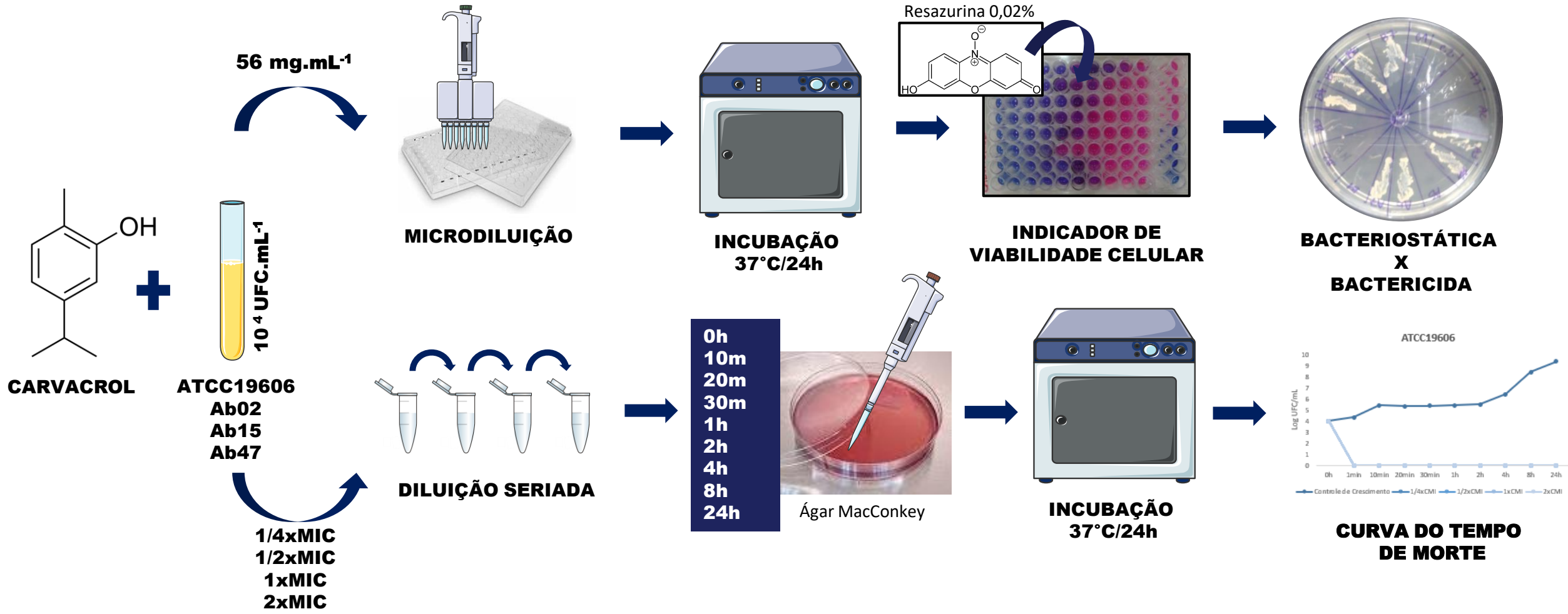
HASSANNEJAD, Niloofar et al. In vivo antibacterial activity of Zataria multiflora Boiss extract and its components, carvacrol, and thymol, against colistin-resistant Acinetobacter baumannii in a pneumonic BALB/c mouse model. **Journal of cellular biochemistry**, v. 120, n. 11, p. 18640-18649, 2019

KACHUR, Karina; SUNTRES, Zacharias. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-12, 2019.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA
Graduação
PPGB Programa de Pós Graduação em Biotecnologia

POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO CARVACROL *IN VITRO* CONTRA *Acinetobacter baumannii* MULTIRRESISTENTE

DÉBORAH TROTA FARIAS DE ALBERNAZ[1]; KAMILA FURTADO DA CUNHA[2]; SUZANE OLACHEA ALLEND[3]; MARCELLE OLIVEIRA GARCIA[4]; DAIANE DRAWANZ HARTWIG[5]



PERFIL FENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E SANITIZANTES EM ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes* DE ORIGEM ALIMENTAR

DIEGO PERES ÁVILA[1]; ITIANE BARCELLOS JASKULSKI[2]; LAÍS ABREU ANASTÁCIO[3]; LUIZ GUSTAVO BACH[4]; WLADIMIR PADILHA DA SILVA[5]; GRACIELA VÖLZ LOPES[6]

[1]Universidade Federal de Pelotas – diiperes1@gmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas – itianebarcellosj@hotmail.com
[3]Universidade Federal de Pelotas – laisabr@gmail.com
[4]Universidade Federal de Pelotas – lugubach@hotmail.com
[5]Universidade Federal de Pelotas – wladimir.padilha2011@gmail.com
[6]Universidade Federal de Pelotas – gracielavlopes@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é um patógeno de importância em alimentos e é o agente etiológico da listeriose em humanos, a qual, apesar de rara, possui alta taxa de letalidade, entre 20 e 30% dos casos. Essa doença pode cursar com sintomas severos, principalmente em gestantes, idosos, imunocomprometidos e recém-nascidos (CDC, 2016; WHO, 2018). Além disso, a distribuição de *L. monocytogenes* no ambiente é ubiquitária, podendo ser isolada de diversos pontos da cadeia produtiva de alimentos e de alimentos prontos para o consumo (SCHEINBERG et al., 2014).

Como maneira de eliminar micro-organismos do ambiente de processamento e equipamentos, a indústria de alimentos opta pela utilização de sanitizantes e a escolha é realizada de acordo com custo, efetividade e modo de aplicação (SILVA et al., 2017). Mesmo com medidas rígidas de higiene e sanitização, *L. monocytogenes* foi detectada em amostras de *beef jerky* e linha de processamento de *beef jerky*, ressaltando, assim, a necessidade de avaliar a resistência da bactéria frente aos sanitizantes (CORADINI et al., 2018). *Beef jerky* é um produto cárneo (bovino), termicamente processado e seco, pronto para o consumo, que tem sido amplamente exportado para Estados Unidos, Canadá, Reino Unido e Japão (CORADINI et al., 2018).

Espécies de *Listeria,* incluindo isolados de *L. monocytogenes* de origem alimentar, geralmente são suscetíveis aos agentes antimicrobianos, no entanto, a exposição sucessiva a esses agentes, faz com que algumas estirpes adquiram genes de resistência, principalmente aqueles localizados em elementos genéticos móveis (MORVAN et al., 2010). Associado à resistência a antimicrobianos, os genes podem levar ao desenvolvimento de resistência cruzada à sanitizantes (KATHARIOS-LANWERMEYER et al., 2012).

Diante do exposto, o objetivo do estudo foi determinar o perfil fenotípico de resistência à antimicrobianos e sanitizantes em isolados de *L. monocytogenes* provenientes de *beef jerky* e linha de processamento de *beef jerky,* avaliando 16 antimicrobianos e os compostos cloreto de benzalcônio, clorexidine, hipoclorito de sódio e ácido peracético.

2. METODOLOGIA

Micro-organismos

Foram utilizados seis isolados de *L. monocytogenes* provenientes de *beef jerky* (n=2) e linha de processamento de *beef jerky* (n=4) previamente identificados e pertencentes ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA/FAEM/UFPel).

Teste de susceptibilidade a antimicrobianos

Os isolados de *L. monocytogenes* foram submetidos ao teste de disco difusão em ágar de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017). Os seguintes discos de antimicrobianos foram utilizados: amicacina (30 µg), ampicilina (10 µg), cefoxitina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), clindamicina (2 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), meropenem (10 µg), ácido nalidíxico (30 µg), penicilina G (10 U), rifampicina (5 µg), estreptomicina (10 µg), sulfametoxazol+trimetoprima (23,75 µg+1,25 µg), tetraciclina (30 µg) e vancomicina (30 µg) (Laborclin, Brazil). Multirresistência foi definida como resistência a três ou mais classes de agentes antimicrobianos.

Concentração inibitória mínima (CIM) para sanitizantes

Foi realizado o teste de CIM para o cloreto de benzalcônio (Sigma-Aldrich©, Irvine, UK), clorexidine (Sigma-Aldrich©, Irvine, UK), hipoclorito de sódio (Dinâmica Química Contemporânea Ltda, Brasil) e ácido peracético (Proc9 Indústria, Brasil) de acordo com as especificações do CLSI, com pequenas modificações (CLSI, 2017). Os isolados foram cultivados em ágar Triptona de Soja (TSA, Oxoid, UK) a 37 ºC por 24 horas. Após a incubação, foram preparadas suspensões bacterianas em solução salina a 0,85% (p / v) (Synth, Brasil), utilizando a escala McFarland número 2 (6×10^8 UFC.mL^{-1}). As placas de microtitulação (CralPlast, Brasil) foram preenchidas com as suspensões bacterianas e com caldo Mueller-Hinton (MH, Oxoid, UK) na proporção de 1:9, utilizando concentrações variáveis dos compostos (de 0,25 a 2048 mg.L^{-1}), com incubação a 37 ºC por 24 horas. A CIM foi definida como a menor concentração que impede o crescimento visível dos isolados. Os experimentos foram realizados em três repetições.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados de *L. monocytogenes* demonstraram resistência a clindamicina, eritromicina, meropenem, rifampicina, sulfametoxazol + trimetoprima e tetraciclina, com um isolado demonstrando resistência adicional à amicacina. A resistência intrínseca a cefoxitina e ácido nalidíxico foi confirmada. Todos os isolados foram classificados como multirresistentes. Os valores da CIM dos sanitizantes avaliados podem ser observados na Tabela 1. Embora não existam valores de referência que definam a resistência de micro-organismos aos sanitizantes, a multiplicação dos isolados foi observada mesmo em altas concentrações dos compostos avaliados.

A detecção de isolados de *L. monocytogenes* multirresistentes a antimicrobianos é uma preocupação em saúde pública, que pode levar a falhas no tratamento da listeriose e a disseminação de genes de resistência entre populações bacterianas. Os elevados valores da CIM observados para os sanitizantes são preocupantes para a indústria de alimentos, haja vista a comum utilização destes compostos para a sanitização de plantas processadoras de alimentos (LEE & HUANG, 2019), principalmente o ácido peracético e o hipoclorito de sódio, os quais são autorizados pela resolução

RDC n° 14/2007 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BERNARDI et al., 2018). A frequente exposição e a utilização em concentrações inadequadas podem promover o desenvolvimento de resistência a esses compostos (ALLEN et al., 2016).

Um estudo desenvolvido no Brasil investigou a resistência a sanitizantes em isolados de *L. monocytogenes* multirresistentes a antimicrobianos, de um abatedouro de frangos para exportação. Os autores observaram susceptibilidade ao cloreto de benzalcônio, clorexidine e hipoclorito de sódio e resistência ao ácido peracético (CARVALHO et al., 2019). Na Itália, um estudo constatou susceptibilidade ao peróxido de hidrogênio, ácido acético e ácido peracético em *L. monocytogenes* e *L. innocua* provenientes de uma planta de processamento de gorgonzola e fazendas leiteiras (COSTA et al., 2018).

Tabela 1. Perfil de resistência a antimicrobianos e concentração inibitória mínima (CIM) de diferentes sanitizantes em isolados de *Listeria monocytogenes* proveniente de amostras de *beef jerky.*

Isolado	Origem	Perfil de resistência a antimicrobianos	CB[a]	CX[b]	HS[c]	AP[d]
			CIM ($\mu g.mL^{-1}$)	CIM ($\mu g.mL^{-1}$)	CIM ($\mu g.mL^{-1}$)	CIM ($\mu g.mL^{-1}$)
L02	BJ*	CLI-ERY-MER-RIF-SUT-TET	64	8	> 2048	> 2048
L03	BJ	CLI-ERY-MER-RIF-SUT-TET	128	8	> 2048	> 2048
L04	Linha de processamento de BJ	CLI-ERY-MER-RIF-SUT-TET	128	16	> 2048	> 2048
L05	Linha de processamento de BJ	CLI-ERY-MER-RIF-SUT-TET	64	8	> 2048	> 2048
L06	Linha de processamento de BJ	AMK-CLI-ERY-MER-RIF-SUT-TET	64	8	> 2048	> 2048
L07	Linha de processamento de BJ	CLI-ERY-MER-RIF-SUT-TET	64	16	> 2048	> 2048

* *Beef jerky*
[a]CB: cloreto de benzalcônio; [b]CX: clorexidine; [c]HS: Hipoclorito de sódio; [d]AP: ácido peracético.

4. CONCLUSÕES

Perfis de multirresistência a antimicrobianos e elevados valores de CIM dos sanitizantes foram observados entre os isolados de *L. monocytogenes* provenientes de *beef jerky* e linha de processamento de *beef jerky*. Os resultados são preocupantes no que se refere à saúde do consumidor e às práticas de sanitização das indústrias de alimentos, apontando necessidade de cautela quanto ao uso desses compostos. Ademais, os resultados evidenciam a necessidade e importância de estudos acerca dos genótipos de resistência e multirresistência a antimicrobianos e sanitizantes, bem como possível transferência horizontal dos genes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, K.J.; WALECKA-ZACHARSKA, E.; CHEN, J.C.; KATARZYNA, K.P.; DEVLIEGHERE, F.; VAN MEERVENNE, E.; OSEK, J.; BANIA, J. *Listeria monocytogenes* – An examination of food chain factors potentially contributing to antimicrobial resistance. **Food Microbiology**, London, v.54, p.178-189, 2016.

BERNARDI, A.O.; STEFANELLO, A.; GARCIA, M.V.; PARUSSOLO, G.; STEFANELLO, R.F.; MORO, C.B.; & COPETTI, M.V. Efficacy of commercial sanitizers against fungi of concern in the food industry. **LWT – Food Science and Technology**, Zurich, v.97, p.25-30, 2018.

CARVALHO, F.T.; VIEIRA, B.S.; VALLIM, D.C.; CARVALHO, L.A.; CARVALHO, R.C.T.; PEREIRA, R.C.L.; & FIGUEIREDO, E.E.S. Genetic similarity, antibiotic resistance and disinfectant susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from chicken meat and chicken-meat processing environment in Mato Grosso, Brazil. **LWT – Food Science and Technology**, Zurich, v.109, p.77-82, 2019.

CDC. **Information for Health Professionals and Laboratories**. Centers for Disease Control and Prevention, 12 dez. 2016. Acessado em 23 jul. 2020. Online. Disponível em: https://www.cdc.gov/listeria/technical.html

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. M100-S27**. PA, USA, 2017. Acessado em 23 jul. 2020. Online. Disponível em: https://clsi.org/media/1469/m100s27_sample.pdf

CORADINI, M.G.L.; MAIA, D.S.V.; IGLESIAS, M.A.; HAUBERT, L.; LOPES, G.V.; DA SILVA, D.A.L.; NERO, L.A.; DA SILVA, W.P. Occurrence and characterization of *Listeria monocytogenes* from beef jerky processing line. **Journal of Food Science Technology**, Pelotas, v.56, pg.436-442, 2018.

COSTA, A.; LOURENÇO, A.; CIVERA, T.; & BRITO, L. *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* strains from dairy plants behave similarly in biofilm sanitizer testing. **LWT – Food Science and Technology**, Zurich, v.92, p.477-483, 2018.

KATHARIOS-LANWERMEYER, S.; RAKIC-MARTINEZ, M.; ELHANAFI, D.; RATANI, S.; TIEDJE, J.M.; KATHARIOU, S. Coselection of Cadmium and Benzalkonium Chloride Resistance in Conjugative Transfers from Nonpathogenic *Listeria* spp. To Other Listeriae. **Applied and Environmental Microbiology**, United States, v.78, p.7549-7556, 2012.

LEE, W.N.; HUANG, C.H. Formation of disinfection by products in wash water and lettuce by washing with sodium hypochlorite and peracetic acid sanitizers. **Food Chemistry: X**, Brussels, v.1, n.100003, 2019.

MORVAN, A.; MOUBARECK, C.; LECLCRQ, A.; HERVÉ-BAZIN, M.; BREMONT, S.; LECUIT, M.; COURVALIN, P.; LE MONNIER, A. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from humans in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States, v.54, n.6, p.2728–2731, 2010.

SCHEINBERG, J.A.; SVOBODA, A.L.; & CUTTER, C.N. High-pressure processing and boiling water treatments for reducing *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus* during *beef jerky* processing. **Food Control**, United Kingdom, v.39, p.105-110, 2014.

SILVA, D.A.; CAMARGO, A.C.; TODOROV, S.D.; NERO, L.A. *Listeria spp.* contamination in a butcher shop environment and *Listeria monocytogenes* adhesion ability and sensitivity to food-contact surface sanitizers. **Journal of Food Safety**, United States, v.37, n.12313, 2017.

WHO. **Listeriosis**. World Health Organization, 20 fev. 2018. Acessado em 23 jul. 2020. Online. Disponível em: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis

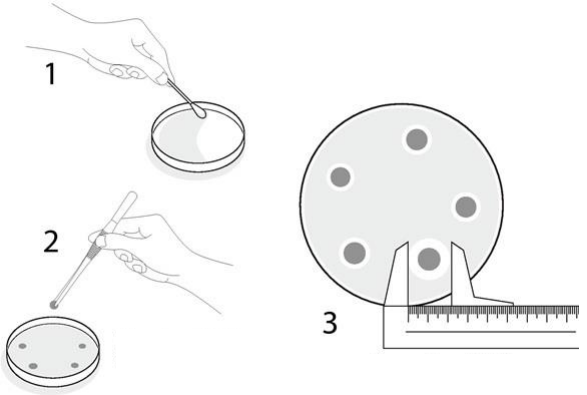
VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

PERFIL FENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E SANITIZANTES EM ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes* DE ORIGEM ALIMENTAR

DIEGO PERES ÁVILA[1]; ITIANE BARCELLOS JASKULSKI[2]; LAÍS ABREU ANASTÁCIO[3]; LUIZ GUSTAVO BACH[4]; WLADIMIR PADILHA DA SILVA[5]; GRACIELA VÖLZ LOPES[6].



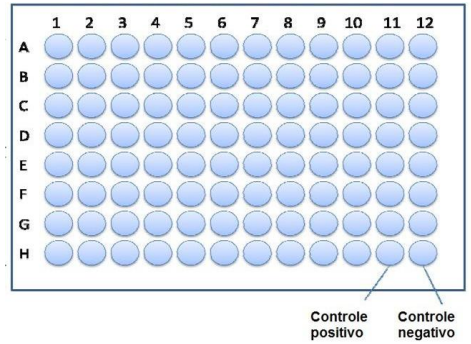
Beef Jerky e linha de produção de *Beef Jerky*



Teste de disco difusão em ágar



Perfil de resistência a antimicrobianos



Teste de concentração inibitória mínima (CIM)



CIM dos sanitizantes

Salmonella spp. EM ALHO-PORÓ COMERCIALIZADO EM FEIRAS LIVRES NO MUNICÍPIO DE PELOTAS – RS

João Paulo de Paiva Lemos[1],Tatiane Kuka Valente Gandra[2], Eliezer Avila Gandra[3]

[1]*Universidade Federal de Pelotas – joaopaulopaivalemos@hotmail.com*
[2]*Universidade Federal de Pelotas – tkvgandra@ufpel.edu.br*
[3]*Universidade Federal de Pelotas – gandraea@hotmail.com*

1. INTRODUÇÃO

O alho-poró (*Allium ampeloprasum* L.) também conhecido como alho-porro ou alho-francês pertence ao grupo das hortaliças de bulbos e à família das Aliáceas, a mesma do alho, cebola e cebolinha (Embrapa, 2010). O seu cultivo teve origem na Ásia Central e desde a antiguidade era utilizado como alimento ou medicamento. No século XXI, o alho-poró continua sendo muito pesquisado devido às qualidades nutricionais e terapêuticas, no Brasil tem a produção concentrada nos Estados da região Sul e Sudeste (Fonseca et al., 2014).

Cada vez mais, a segurança dos alimentos é tida como alvo de discussão em muitos estudos, sendo relevante tanto para o consumidor, quanto para fornecedor. *Salmonella spp*. é um dos microrganismos mais amplamente distribuídos na natureza, sendo o homem e os animais seus principais reservatórios naturais (Shinohara et al., 2008). A salmonelose é uma das doenças transmitidas por alimentos (DTA) mais preocupantes para a saúde pública em todo o mundo, pelas suas características endêmicas e pelo seu controle depender muito da ação humana, visto que o homem pode ser disseminador dessa bactéria (Silva & Bitello, 2016).

2. METODOLOGIA

Foram coletadas 40 amostras de 100 gramas de alho poró, vegetal considerado como “condimento” ou “tempero”, muito utilizado na gastronomia brasileira. As amostras foram adquiridas em feiras livres da cidade de Pelotas-RS. A cada coleta eram adquiridas, na forma como eram comercializadas, duas amostras, totalizando 20 coletas no período de março de 2018 a março de 2020.

As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com as recomendações propostas pela American Public Health Association (APHA) (Downes & ito, 2001) com modificações.

As amostras foram pesadas e identificadas assepticamente. Para o isolamento de *Salmonella* spp. foi realizado pré-enriquecimento em água peptonada

tamponada a 37°C por 24 horas, enriquecimento seletivo em Caldo Rappaport-Vassiliadis a 42°C por 24 horas e Caldo Tetrationato a 37°C por 24 horas. Em seguida, foi feito semeadura em placas de Ágar Desoxicolato-Lisina-Xilose (XLD) e Ágar Hektoen-Enteric (HE), sendo ambos incubados por 24 horas a 37°C. Colônias típicas foram submetidas à identificação bioquímica em Ágar Tríplice Ferro (TSI), Ágar Lisina Ferro (LIA) e Ágar Urease a 37°C por 24 horas. As amostras que apresentaram reação bioquímica característica foram submetidas à identificação sorológica, utilizando-se os soros polivalentes anti-salmonella somático e flagelar (Probac).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão dispostos os resultados obtidos para e coliformes termotolerantes em amostras de alho poró.

Tabela 1- Pesquisa de *Samonella* spp. em 40 amostras de alho poró vendidos em feiras livres da cidade de Pelotas-RS, Brasil, 2018-2020.

Amostra (n)	*Salmonella* spp. n (%)*
Alho poró (40)	2 (10)

n – número de amostras analisadas.
*Amostras com a presença de *Salmonella* spp.

Das 40 amostras de Alho Poró analisadas, duas (10%) apresentaram contaminação por *Salmonella* spp., segundo a RDC nº12 de 2001, estabelece que *Salmonella* spp. em raízes, tubercúlos e similares deve ser ausente em 25g. Embora haja poucas pesquisas referentes a contaminação do Alho Poró, a observação de alimentos diferentes relacionados ao mesmo microrganismo permitiu concluir que a manipulação inadequada durante a manipulação alimentos é o principal fator de contaminação (Kottwitz et al., 2008) e esta pode ser a provável causa da presença de Salmonella em duas amostras.

Considerando que as salmoneloses são as grandes responsáveis pela maioria das infecções alimentares humanas (Tirolli & Costa, 2006) os resultados encontrados denotam um risco potencial e a necessidade de adequação as boas práticas de manipulação neste tipo de produto.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se, portanto, que a presença de *Salmonella* verificada nas amostras denota uma situação preocupante, ficando claro a necessidade de melhoria dos métodos de higiene e sanidade na manipulação deste tipo de produto.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DOWNES, F. P.; ITO, H. **Compendium Of Methods for the microbiological examination of foods**.. 4. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 676 p. 2001.

Embrapa. **Catálogo Brasileiro de Hortaliças: Saiba como plantar e aproveitar 50 das espécies mais comercializadas no país**. Brasília. Embrapa Hortaliças. 60 p, 2010. Disponível em:< http://www.ceasa.gov.br/dados/publicacao/Catalogo%20hortalicas.pdf >. Acesso em: 28 de julho de 2020.

Fonseca, G. M.; Passos, T. C.[I]; Ninahuaman, M. F. M. L.; Caroci, A. S.; Costa, L.S. **Avaliação da atividade antimicrobiana do alho (*Allium sativum* Liliaceae) e de seu extrato aquoso** .. Rev. bras. plantas med. Vol.16 no.3 supl.1 Botucatu 2014

Kottwitz, L.B.M.; Back, A.; Leão, J. A.; Alcocer, I.; Karan, M.; Oliveira, T.C.R.M. **Contaminação por Salmonella spp. em uma cadeia de produção de ovos de uma integração de postura comercial ..** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. Vol.60 no.2 Belo Horizonte Apr. 2008

RDC: Resolução nº 12 , de 02 de janeiro. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasil, 2001.

Silva, V. M.; Bitello, A. R. **Verificação da presença de *Salmonella spp* em alimentos minimamente processados em um munipío do interior do Rio Grande do Sul** .. Revista Destaques Acadêmicos, Lajeado, v. 8, n. 3, p. 109-115, 2016. ISSN 2176-3070

Shinohara, N. K. S.; Barros, V. B.; Jimenez, S. M. C.; Machado, E. C. L.; Dutra, R. A. F.; Filho, J. L. L. ***Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos** SciELO - Scientific Electronic Library Online v. 13 n. 5, 2008 . ISSN 1675-1683

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

PPGB Programa de Pós Graduação em Biotecnologia

Tirolli I. C. C.; Costa , C. A. **Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos recém abatidos em feiras e mercados da cidade de Manaus-AM** .. Acta Amaz. Vol.36 no.2 Manaus 2006

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

Laboratório de Ciência dos Alimentos e Biologia Molecular

Salmonella spp. EM ALHO-PORÓ COMERCIALIZADO EM FEIRAS LIVRES NO MUNICÍPIO DE PELOTAS – RS

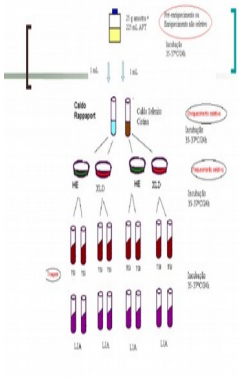
João Paulo de Paiva Lemos[1],Tatiane Kuka Valente Gandra[2], Eliezer Avila Gandra[3]



Feiras Livres



Alho Poró



Pesquisa da Presença de *Salmonella* spp.

Presença +



Ausência –



DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *L. monocytogenes* PROVENIENTES DE SUSHIS

LAÍS ABREU ANASTÁCIO[1]; DIEGO PERES ÁVILA[2], LUÍZ GUSTAVO BACH[2], NATALIE RAUBER KLEINUBING[2], TASSIANA RAMIRES[2]; WLADIMIR PADILHA DA SILVA[3]

[1]Universidade Federal de Pelotas – laisabr@gmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas – diiperes1@gmail.com; lugubach@hotmail.com; nataliek10@hotmail.com; tassianaramires@gmail.com
[3]Universidade Federal de Pelotas – wladimir.padilha2011@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística aponta o crescimento e popularização de alimentos prontos pra consumo no nosso país (IBGE, 2019). Essa categoria engloba os alimentos preparados, pré-cozidos ou cozidos, que para o seu consumo não necessitam da adição de outros ingredientes e não são submetidos a nenhum tipo de tratamento térmico capaz de reduzir, ou eliminar, possíveis patógenos presentes (BRASIL, 2005; CFS, 2014).

O sushi é um alimento pronto para consumo, tradicional da cultura japonesa. É constituído, principalmente, por pescado cru, podendo, ou não, apresentar arroz cozido e alga marinha (LORENTZEN et al., 2012). Além de ser servido sem cocção, o sushi é muito manipulado, o que potencializa a possibilidade de contaminação do produto por micro-organismos patogênicos (LIANG et al., 2016; RAMIRES et al., 2020).

Dentre as bactérias de interesse em alimentos, destaca-se *Listeria monocytogenes*, patogênica para humanos e animais, psicrotrófica, anaeróbia facultativa e de distribuição ubiquitária (OIE, 2018). A infecção causada por esse patógeno é denominada listeriose, a qual pode cursar com sintomatologia branda, podendo evoluir para sintomas mais graves, em casos de infecção sistêmica (LEPE, 2020). Um estudo recente, na União Europeia, demonstra que mais de 90% dos casos de listeriose sistêmica são causados pela ingestão de alimentos prontos para consumo contaminados com *L. monocytogenes* (EFSA, 2018). Em gestantes, idosos, recém-nascidos e imunocomprometidos, a doença pode ser fatal, atingindo até 30% de taxa de letalidade (MILLIOTS & BIER, 2003; LEPE, 2020).

O estudo epidemiológico das Doenças Transmitidas por Alimentos é de extrema importância, tornando possível correlacionar isolados bacterianos obtidos de pessoas doentes, de alimentos contaminados e dos locais onde os alimentos são produzidos, identificando as prováveis fontes de contaminação e/ou a persistência de um micro-organismo nos ambientes de processamento de alimentos (CDC, 2016). Nesse sentido, a técnica denominada eletroforese em gel de campo pulsado (*pulsed-field gel electrophoresis* - PFGE) é considerada o padrão-ouro para o estudo da diversidade genética de *L. monocytogenes* (NEOH et al., 2019; BARRIA et al., 2020; D'ARRIGO et al., 2020).

Frente ao exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a diversidade genética de seis isolados de *L. monocytogenes,* provenientes de

sushis comercializados em dois estabelecimentos especializados em culinária japonesa, do município de Pelotas, Rio Grande do Sul.

2. METODOLOGIA

Foram avaliados seis isolados de *L. monocytogenes,* previamente caracterizados, provenientes de sushis comercializados em dois estabelecimentos (A e B), no município de Pelotas, Rio Grande do Sul. (RAMIRES et al., 2016). A avaliação da diversidade genética foi realizada pela técnica de PFGE, utilizando as enzimas de restrição *AscI* e *ApaI* (New England BioLabs®), assim como descrito por Graves e Swaminathan (2001). Os produtos de macrorrestrição foram separados por PFGE, em CHEF-DR II (BioRad®), totalizando 20 horas de corrida. O gel obtido foi corado com GelRed™ (Biotium) e os padrões de bandas observados foram analisados usando BioNumerics 7.1 (Applied Maths), com o critério de 1,5% de similaridade entre as bandas. *Salmonella* Braenderup H9812 foi usado como marcador de referência.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de PFGE é amplamente utilizada na área de alimentos para rastrear e monitorar contaminações persistentes por patógenos bacterianos em todas as estapas de produção (NEOH et al., 2019; D'ARRIGO et al., 2020). Os seis isolados de *L. monocytogenes* foram submetidos à essa tecnica, resultando em quatro perfis distintos de macrorrestrição. Quatro isolados oriundos do estabelecimento A, exibiram três diferentes perfis de macrorestrição (PI, PII, PIII), enquanto apenas um perfil de macrorrestrição foi evidenciado entre os dois isolados provenientes do estabelecimento B. O perfil PIII agrupou dois isolados do estabelecimento A, enquanto no perfil PIV, foram agrupados dois isolados do estabelecimento B. Esse resultado indica a persistência de *L. monocytogenes* nos dois estabelecimentos avaliados, haja vista que cada isolado foi obtido a partir de coletas realizadas em dias diferentes, com intervalo de pelo menos um mês entre cada uma delas. A persistência de *L. monocytogenes* deve-se, provavelmente, à capacidade do patógeno de formar biofilme em diferentes superfícies de equipamentos e utensílios, os quais entram em contato com os alimentos constituintes do sushi, propiciando a contaminação contínua do produto (MIAO et al., 2019). No presente estudo, verificou-se baixa similaridade genética entre os três perfis de macrorrestrição dos isolados provenientes do estabelecimento A e do perfil obtido no estabelecimento B (25,4%).

Barria et al. (2020) estudaram a diversidade genética de 52 isolados de *L. monocytogenes* provenientes de amostras de queijos artesanais e do ambiente de processamento, de cinco diferentes produtores no Chile. Os autores descreveram a persistência do patógeno nos estabelecimentos, tendo em vista que identificaram os mesmos perfis de macrorrestrição em diferentes datas de coletas, assim como foi observado neste estudo. Além disso, os autores sugeriram que essa persistência ocorreu devido a falhas nas práticas de limpeza e saneamento implementadas pelos produtores, as quais foram ineficientes para a erradicação de *L. monocytogenes* das instalações.

A presença de uma grande variedade de isolados de *L. monocytogenes* com relação clonal foi descrita em 10 plantas de processamento de presunto curado a seco, na Espanha (D'ARRIGO et al., 2020). Em nove delas houve a presença de isolados persistentes, os quais foram assim caracterizados por terem sido obtidos pelo menos quatro vezes, dentro do intervalo de dois anos. Um total de 26 perfis de macrorrestrição persistentes foram identificados. Dois perfis foram comuns a duas plantas de processamento, os quais foram identificados antes e depois da limpeza e desinfecção, além de serem isolados no produto final. Esse resultado demonstra que isolados persistentes no ambiente de processamento de alimentos podem vir a contaminar o produto final, gerando perigo à saúde do consumidor, assim como foi observado neste estudo.

No estabelecimento A foram identificados três diferentes perfis de macrorrestrição. A presença de diversos padrões de restrição indica múltiplas fontes de contaminação ao longo da linha de produção do alimento avaliado, indicando possível deficiência da limpeza e desinfecção do ambiente da planta de processamento (GARCÍA-SÁNCHEZ et al., 2019; DANTAS et al., 2019).

4. CONCLUSÕES

Listeria monocytogenes provenientes de sushis apresentaram diversidade genética, o que indica contaminação do alimento por diversas fontes. Por outro lado, a relação clonal entre isolados obtidos de sushis provenientes de coletas diferentes, sugere a presença de uma fonte de contaminação persistente na linha de produção de sushi nos dois estabelecimentos avaliados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Perguntas e Respostas: Padrões Microbiológicos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, julho de 2020. Acessado em 24 de julho de 2020. Online. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/2810640/Padr%C3%B5es+microbiol%C3%B3gicos/e0206465-1392-4333-a2dc-9feef2dbf462

BARRÍA et al. Tracing *Listeria monocytogenes* contamination in artisanal cheese to the processing environments in cheese producers in southern Chile. **Food Microbiology**, Chile, 2020.

BRASIL. **Resolução RDC Nº 273**. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, 2005.

CDC (Centers of Disease Control and Prevention). **Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE).** Centers of Disease Control and Prevention, feveiro de 2016. Acessado em 25 de julho de 2020. Online. Disponível em: https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html

CFS (Centre for Food Safety). **Microbiological Guidelines for Food - For readyto-eat food in general and specific food items.** Centre of Food Safety, agosto de 2014. Acessado em 24 de julho de 2020. Online. Disponível em: https://www.cfs.gov.hk/english/food_leg/files/food_leg_Microbiological_Guidelines_for_Food_e.pdf

DANTAS et al. Environmental persistence and virulence of *Salmonella* spp. isolated from a poultry slaughterhouse. **Food Research International**. Brazil, 2020

D'ARRIGO et al. Characterization of persistent *Listeria monocytogenes* strains from ten dry-cured ham processing facilities. **Food Microbiology**, Madried, v. 92, 103581, 2020.

EFSA (European Food Safety Authority), 2018. RICCI, A.; ALLENDE, A.; BOLTON, D. et al. ***Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU**. Scientific Opinion: EFSA Journal, janeiro de 2018. Acessado em 24 de julho de 2020. Online. Disponível em: https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5134

GARCÍA-SÁNCHEZ et al. Biofilm formation, virulence and antimicrobial resistance of different *Campylobacter jejuni* isolates from a poultry slaughterhouse. **Food Microbiology.** Spain, v. 83, n. 1, p.193-199, 2019.

GRAVES, L.M.; SWAMINATHAN, B. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis**. International Journal of Food Microbiology**, v. 65, p. 55–62, 2001.

IBGE. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2017 – 2018: Primeiros Resultados**. Agência de Notícias do IBGE. Rio de Janeiro, 04 de outubro de 2019. Acessado em 24 de julho de 2020. Online. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101670.pdf

LEPE, A. J. Current aspects of listeriosis. **Medicina Clínica**, Spain, v. 154, n. 11, p. 453-458, 2020.

LIANG et al. The microbiological quality of take-away raw salmon finger sushi sold in Hong Kong. **Food Control**, Hong Kong, v. 69, n.1, p. 45–50, 2016.

LORENTZEN et al. Viability *of Listeria monocytogenes* in an experimental model of nigiri sushi of halibut (Hippoglossus hippoglossus) and salmon (Salmo salar). **Food Control**, Norway, v. 25, n.1, p. 245-248, 2012.

MIAO et al. Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* under food heat processing conditions: first report on CML production within biofilm. **Scientific Reports**. China, 2020

MILLIOTS, M. D. & BIER, J. W. **International handbook of Foodborne Pathogens.** New York, Marcel Dekker, Inc, 2003

NEOH et al. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the "gold standard" for bacteria typing and current alternatives**. Infection, Genetics and Evolution, Malaysia**, v. 74, 2019.

OIE (World Organization for Animal Health). ***Listeria Monocytogenes***. OIE (World Organization for Animal Health), 2018. Acessado em 25 de julho de 2020. Online. Disponível em: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.09.06_LISTERIA_MONO.pdf

RAMIRES et al. First report of *Escherichia coli* O157:H7 in ready-to-eat sushi. **Journal of Applied Microbiology**, Brazil, 2020.

RAMIRES et al. Isolamento e perfil de resistência a antimicrobianos de *Listeria monocytogenes* provenientes de sushis comercializados na cidade de Pelotas-RS. In: **XVIII ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**, 1., Pelotas, 2016, **Anais**...Pelotas: Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, 2016.

Graduação

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA

Saúde única

IV MOSTRA ACADÊMICA

PPGB Programa de Pós Graduação em Biotecnologia

DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *L. monocytogenes* PROVENIENTES DE SUSHIS

LAÍS ABREU ANASTÁCIO[1]; DIEGO PERES ÁVILA[2], LUÍZ GUSTAVO BACH[2], NATALIE RAUBER KLEINUBING[2], TASSIANA RAMIRES[2]; WLADIMIR PADILHA DA SILVA[3]



Sushi é um alimento pronto para consumo bastante popular no Brasil.



Muito manipulado e não passa por nenhum tipo de tratamento térmico



Favorecendo sua contaminação por patógenos alimentares, como *Listeria monocytogenes.*



Listeriose é a infecção alimentar causada por *L. monocytogenes* e pode ser fatal (taxa de letalidade em torno de 30%)

A **relação clonal** entre os isolados obtidos a partir de **coletas diferentes**, sugere a presença de uma fonte de **contaminação persistente** na linha de produção

6 isolados de ***L. monocytogenes*** provenientes de sushis foram submetidos à técnica de **PFGE**

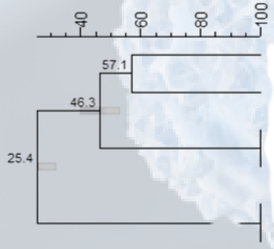
descrita por Graves e Swaminathan (2001)

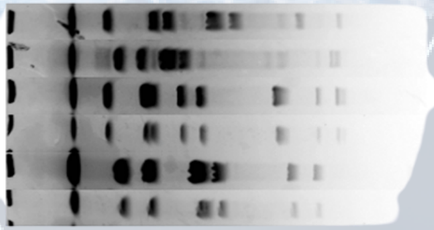
A avaliação foi feita a partir de isolados previamente caracterizados.

4 PERFIS DISTINTOS DE MACRORRESTRIÇÃO

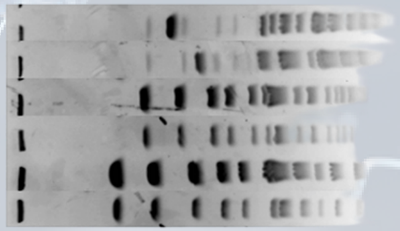
O perfil **III** englobou **dois isolados** do estabelecimento **A**.

O perfill **IV** englobou **dois isolados** do estabelecimento **B**.





AscI



ApaI

ID	Pulsotipos	EST	Data de coleta
L1	P I	A	8 de fevereiro de 2016
L10	PII	A	9 de março de 2016
L11	PIII	A	4 de abril de 2016
L17	PIII	A	11 de maio de 2016
L16	PIV	B	4 de abril de 2016
L20	PIV	B	11 de maio de 2016

LEGENDA: ID = Identificação dos isolados; EST = estabelecimento especializado em culinária japonesa

DETECÇÃO DE VÍRUS QUE ACOMETEM *APIS MELLIFERA* EM APIÁRIOS DO SUL DO BRASIL

LARIANE DA SILVA BARCELOS[1]; DOMITILA BRZOSKOWSKI CHAGAS[2]; MATHEUS IURI FRÜHAUF[3]; NADÁLIN YANDRA BOTTON[4]; FRANCIELLE LIZ MONTEIRO[5]; GEFERSON FISCHER[6]

[1]*Universidade Federal de Pelotas – larianebarcelos@gmail.com*
[2]*Universidade Federal de Pelotas – chagas.domitila@gmail.com*
[3]*Universidade Federal de Pelotas – matheus.fruhauf@outlook.com*
[4]*Universidade Federal de Pelotas – nadalinyb@gmail.com*
[5]*Hospital de Clínicas de Porto Alegre – franciellemonteiro09@gmail.com*
[6]*Universidade Federal de Pelotas – geferson.fischer@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

A apicultura, prática já consolidada em diversos países, iniciou no Brasil nos anos 1800, com a introdução de colônias de *Apis mellifera* no Rio de Janeiro, sendo impulsionada no século XX, sobretudo a partir dos anos 70 e 80 (SOUZA, 2007). Atualmente, traz destaque ao Brasil pela grande produção e exportação de mel, que é fruto exclusivo da atividade das abelhas (MALISZEWSKI, 2019; VIDAL, 2019). Muito além da prática econômica, a importância desses insetos também se deve ao fato de serem fundamentais para processos vitais no planeta, tais como a biodiversidade e polinização (REIS; ARAGÃO, 2015). No entanto, sua sanidade é ameaçada por inúmeros fatores, dentre eles, os agentes virais. A presença de vírus na colônia pode trazer diversas consequências, desde queda na produtividade até a morte em massa de abelhas, causando prejuízos ao produtor e ao ambiente polinizado por elas (VAN ENGELSDORP et al., 2009).

O Brasil tem enfrentado graves perdas de colônias, sendo relatada a morte de meio bilhão de abelhas, sobretudo nos estados da região sul, que são responsáveis por boa parte da produção apícola no país (CASTILHOS et al., 2019; GRIGORI, 2019). As causas permanecem incertas, havendo, no entanto, hipóteses a respeito do que teria afetado as colônias, como por exemplo, os vírus (CHAGAS et al., 2019). Dos agentes virais que afetam a saúde das *A. mellifera*, destacam-se: o vírus deformador de asas (*Deformed wing virus*, DWV), vírus da cria ensacada (*Sacbrood bee virus*, SBV), vírus da paralisia aguda das abelhas (*Acute bee paralysis virus*, ABPV), vírus da paralisia aguda israelense (*Israeli acute paralysis virus*, IAPV), vírus da realeira negra (*Black queen cell virus*, BQCV) e vírus da paralisia crônica das abelhas (*Chronic bee paralysis virus*, CBPV) (McMENAMIN et al., 2018). Assim, tendo em vista a escassez de dados sobre a ocorrência destes vírus no Brasil e a alta mortalidade de abelhas relatada na região sul do país, o objetivo do presente estudo foi investigar a presença de DWV, SBV, ABPV, IAPV, BQCV e CBPV em apiários da região sul.

2. METODOLOGIA

As amostras analisadas abrangeram cidades de dois estados do sul brasileiro. Foram obtidas 105 amostras de 16 apiários do estado do Rio Grande do Sul (RS), compreendendo os municípios de Piratini, Canguçu, Arroio do Padre, Capão do Leão e Pelotas; e 59 amostras de 11 apiários do estado de Santa Catarina (SC), dos municípios de São Carlos, Saudades, Flor do Sertão, São Miguel do Oeste, Formosa do Sul, Maravilha e Nova Erechim. Cada amostra foi composta por 30 abelhas de uma colmeia, coletadas aleatoriamente e mantidas sob refrigeração até a chegada ao Laboratório, quando foram congeladas à temperatura de -70^{o}C. Após o congelamento, foram seccionados os abdomens de seis abelhas adultas, os quais foram macerados e homogeneizados com 1mL de TRIzol® (*Life Technologies*, Carlsbad, CA). Após esta etapa inicial, foi seguido o protocolo do TRIzol® para a extração de RNA, conforme instruções do fabricante.

Após a extração do RNA, realizou-se a transcrição reversa para obtenção do DNA complementar (cDNA) com o *kit* iScript™ (BioRad). Posteriormente, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada em dois *multiplex*, sendo amplificadas regiões específicas de três vírus em cada: o *multiplex* 1, para a detecção de SBV, CBPV e ABPV (TEIXEIRA et al., 2008; TSEVEGMID et al., 2016) e o *multiplex* 2, para DWV, BQCV e IAPV (TEIXEIRA et al., 2008; HOU et al., 2014; TSEVEGMID et al., 2016). Todas as reações de PCR ocorreram em tubos do tipo *eppendorf* com volume final de 25µL, utilizando 1x de GoTaq® *Colorless Master Mix* (Fitchburg, Wisconsin, EUA), 0,4µM de cada primer e 2µL de cDNA (100 – 200ng). Os produtos da PCR foram revelados em gel de agarose 1,5%, utilizando o corante *Blue Green Loading Dye I* (Cotia, São Paulo, BR). Os géis foram visualizados sob luz UV após eletroforese por 40 minutos sob 80V.

Como controle endógeno, foi utilizado o GAPDH, com o objetivo de verificar a correta extração do RNA das amostras. Como controle positivo, foram utilizados fragmentos de genes sintéticos (gBlock®, *Integrated DNA Technologies*) e água ultrapura como controle negativo. As condições da PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 94ºC por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 94ºC por 30 segundos, 55ºC por 30 segundos e 72ºC por 40 segundos, seguidos de extensão final a 72ºC por 7 minutos. Amostras positivas foram purificadas com o *kit* PureLink® *Quick Gel Extraction and PCR Purification* (Thermo Fischer) e submetidas ao sequenciamento, utilizando o *BigDye* (TermoFisher), para confirmar a identidade dos vírus detectados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 164 amostras, obtidas de 27 apiários da região sul do Brasil, com o objetivo de detectar seis vírus que infectam *Apis mellifera*. Das amostras provenientes de SC, foram identificados o DWV (1/59) e BQCV (5/59) em amostras de Formosa do Sul, isolados e em coinfecção, representando 1,69% e 8,47% das amostras desse estado, respectivamente. Os resultados demonstram que há circulação desses vírus em apiários de SC, apontando para a necessidade de mais estudos analisando sua prevalência e distribuição.

Dos cinco municípios analisados do RS, quatro apresentaram amostras positivas para o BQCV (38/105), dois para o ABPV (3/105) e um para o DWV (1/105), representando 36%, 2,86% e 0,95% das amostras desse estado. Houve, também, a identificação de coinfecção por BQCV e ABPV, em um apiário de Piratini. Corroborando com nossos resultados, MURRAY et al. (2018) detectaram BQCV com maior incidência dentre os vírus detectados (BQCV, DWV e SBV) em amostras dos Estados Unidos, assim como ABOU KUBAA et al. (2018), que detectaram BQCV em 29% das amostras analisadas. Esse vírus pode provocar a morte de larvas e pupas de rainha, afetando seriamente o desenvolvimento da colônia (SPURNY et al., 2017), o que torna os resultados preocupantes. Amostras foram submetidas ao sequenciamento, confirmando a identidade dos vírus detectados.

4. CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que há circulação de BQCV, ABPV e DWV em apiários do sul brasileiro, com destaque ao estado do RS, onde foi identificada alta infecção por BQCV. Esses dados colocam em alerta os apicultores da região, uma vez que esses agentes virais afetam a saúde e produção das abelhas, além de unirem-se às hipóteses a respeito das perdas de colônias.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU KUBAA, R.; MOLINATTO, G.; SOLAIMAN KHALED, B.; et al. First detection of black queen cell virus, Varroa destructor macula-like virus, Apis mellifera filamentous virus and Nosema ceranae in Syrian honey bees Apis mellifera syriaca. **Bulletin of Insectology**, v.71, n.2, p.217–224, 2018.

CASTILHOS, D.; BERGAMO, G. C.; GRAMACHO, K. P.; et al. Bee colony losses in Brazil: a 5-year online survey. **Apidologie**, v.50, n.3, p.263-272, 2019.

CHAGAS, D. B.; MONTEIRO, F. L.; HÜBNER, S. O.; et al. Viruses that affect Apis mellifera and their occurrence in Brazil. **Ciência Rural**, v.49, n.9, p.1-8, 2019.

GRIGORI, P. **Meio bilhão de abelhas morreram no Brasil** — e isso é uma péssima notícia. Agência Pública/Repórter Brasil. Acessado em 18 jul 2020. Online. Disponível em: exame.com/brasil/meio-bilhao-de-abelhas-morreram-no-brasil-e-isso-e-uma-pessima-noticia/

HOU, C.; RIVKIN, H.; SLABEZKI, Y.; et al. Dynamics of the presence of israeli acute paralysis virus in honey bee colonies with colony collapse disorder. **Viruses**, v.6, n.5, p.2012-2027, 2014.

MALISZEWSKI, E. **Mel brasileiro no topo**. Entrevista com Celio Hercílio Marcos da Silva. Agrolink. Acessado em 20 jul 2020. Online. Disponível em: agrolink.com.br/noticias/mel-brasileiro-no-topo_424254.html

McMENAMIN, A. J.; GENERSCH, E. Honey bee colony losses and associated viruses. **Current Opinion in Insect Science**, v.8, p.121–129, 2015.
MURRAY, E. A.; BURAND, J.; TRIKOZ, N.; et al. Viral transmission in honey bees and native bees, supported by a global black queen cell virus phylogeny. **Environmental microbiology**, p.1-28, 2018.

REIS, J.; ARAGÃO, T. Viabilidade econômica da apicultura no município de Botucatu –SP. **Revista IPecege**, p.26-35, 2015.

SOUZA, D. C. **Importância Socioeconômica da Apicultura: Manual do Agente de Desenvolvimento Rural**. Brasília: SEBRAE, p.29-36, 2007.

SPURNY, R.; PŘIDAL, A.; PÁLKOVÁ, L.; et al. Virion structure of black queen cell virus, a common honeybee pathogen. **Journal of virology**, v.91, n.6, 2017.

TEIXEIRA, E. W.; CHEN, Y.; MESSAGE, D.; et al. Virus infection in Brazilian honey bees. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.99, p.117-119, 2008.

TSEVEGMID, K.; NEUMANN, P.; YAÑEZ, O. The honey bee pathosphere of Mongolia: European viruses in Central Asia. **PLOS ONE**, v.11, p.1-16, 2016.

VAN ENGELSDORP, D.; EVANS, J.D.; SAEGERMAN, C.; et al. Colony collapse disorder: a descriptive study. **PLOS ONE**, v.4, 2009.

VIDAL, M. F. Evolução da produção de mel na área de atuação do BNB. **Caderno Setorial ETENE**, v.4, n.62, p.1-7, 2019.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA

Saúde única

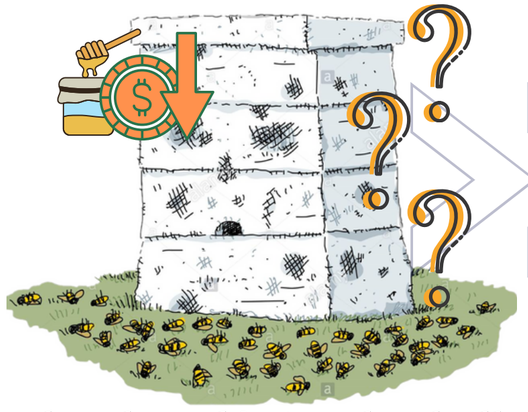
IV MOSTRA ACADÊMICA

Graduação

PPGB Programa de Pós Graduação em Biotecnologia

DETECÇÃO DE VÍRUS QUE ACOMETEM *APIS MELLIFERA* EM APIÁRIOS DO SUL DO BRASIL

LARIANE DA SILVA BARCELOS; DOMITILA BRZOSKOWSKI CHAGAS; MATHEUS IURI FRÜHAUF; NADÁLIN YANDRA BOTTON; FRANCIELLE LIZ MONTEIRO; GEFERSON FISCHER



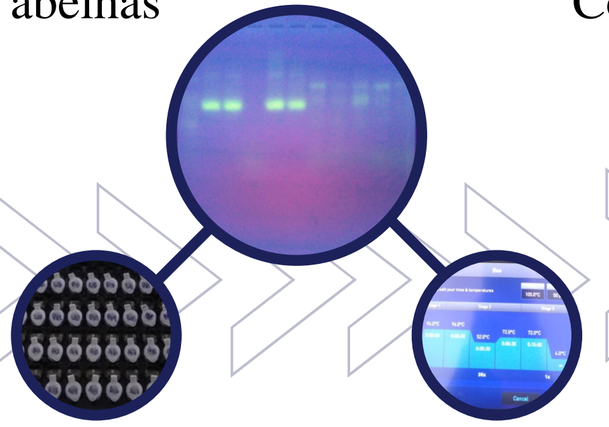
Perdas de colônias de abelhas



Coletas em apiários



Extração de RNA e síntese de cDNA



PCR *multiplex*



Detecção dos vírus BQCV, DWV e ABPV

Imagens: arquivo pessoal, canva e alamy

SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS QUERATINOLÍTICOS PARA UTILIZAÇÃO EM PROCESSO FERMENTATIVO DE HIDRÓLISE DE RESÍDUOS AVÍCULAS

LARISSA APARECIDA ALMEIDA DE BRITO[1]
ANA MARIA MAZOTTO DE ALMEIDA[2]

[1]Laboratório de Biocatálise Microbiana, Instituto de Microbiogia Paulo de Góes, UFRJ – laabrito9@gmail.com
[2]Laboratório de Biocatálise Microbiana, Instituto de Microbiogia Paulo de Góes, UFRJ – anamazotto@micro.ufrj.br

1. INTRODUÇÃO

A alimentação humana causa um grande impacto ambiental, em média, o Brasil produz 13 milhões de ton. de carne de frango por ano (AVISITE, 2018) com uma produção de resíduos de penas de aproximadamente 800 mil ton. anuais (ABPA, 2017). Sendo um resíduo de demorada degradação no ambiente, as penas são um grande problema para o descarte, porém, são compostas basicamente por queratina, que se apropriadamente processada pode ser convertida em diversos outros produtos com valor comercial, como por exemplo, suplementos alimentares, bioplásticos ou fibras têxteis. Diante da necessidade de soluções inovadoras para o aproveitamento das penas provenientes da criação industrial e a necessidade de ofertar insumos mais sustentáveis para a indústria têxtil e considerando o metabolismo microbiano na biocatálise, este trabalho visou o isolamento e seleção de microrganismos produtores de queratinases para degradação da rígida estrutura das penas e reaproveitamento deste resíduo. Para alcançar este objetivo, pelo de gato (substrato constituído basicamente por queratina e extremamente resistente à hidrólise) foi enterrado em microcosmo contendo solo cultivado com planta ornamental *Capsicum annuum,* uma vez que a densidade microbiana em rizosferas é elevada. Após 60 dias, amostras de solo foram retiradas e transferidas para meios de cultura contendo penas de frango ou pelo de gato como principal fonte de carbono, sendo este um meio de enriquecimento para queratinolíticos. A incubação ocorreu por 14 dias sob agitação, seguindo de isolamento dos microrganismos presentes por diluição, plaqueamento e esgotamento em meio Luria Bertani (LB) sólido. Os isolados foram incubados em meio contendo penas como principal fonte de carbono por 7 dias. A degradação de penas, assim como a concentração de proteína solúveis no meio de cultura foram analisadas e quantificadas.

2. METODOLOGIA

2.1 Isolamento de microrganismos queratínolíticos

Foi incubado aproximadamente 1g de solo de Capsicum annuum contendo pelo de gato enterado em erlen com solução NaCl 0,85% e outro com solução NaCl 0,85% e pena de frango, apos 14 dias houve diluição e semeadura em placa de petri com meio LB sólido, codificadas como PGSP para o Erlen com somente solo e PSP para o Erlen com solo e pena. Feito re-

esgotamento com 10 microorganismos: PGSP01, PGSP2.1, PGSP2.2, PGSP3.1, PGSP3.2, PSP03, PSP1.1, PSP1.2, PSP2.1, PSP2.2.

2.2 Seleção dos microrgasnismos em meio contendo penas como fonte de carbono

Os microrganismos isolados foram incubados em 10mL de meio Lurian Bertani líquido durante 48hrs e após o crescimento microbiano cada pellet foi ressuspendido com NaCl 0,85% e incubado em 50mL de meio base de sais com 0,5g de penas de granja durante 7 dias. Os experimentos foram conduzidos em duplicata.

2.3 Mensuração da degradação de penas

Para mensurar a degradação final das penas foi feito a filtração do meio com papel de filtro qualitativo 12,5cm de diâmetro ao final o crescimento microbiano e feito um cálculo analitico com as variáveis: peso do filtro antes e depois da filtração.

2.4 Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteínas foi determinada de acordo com o método de Lowry (Lowry et al., 1951).

2.5 Zimografia

A análise zimográfica foi realisada como descrito por Mazotto et al (2011) utilizando gelatina 1% como substrato, Tris-HCl 10 mM pH 7,4 como tampão de proteólise e período de incubação de 20 h a 37ºC.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas oito cepas de bactérias, diferenciadas por características coloniais, nomeadas como PGSP 01, PGSP 2.2, PGSP 3.1, PGSP 3.2, PSP 1.1, PSP 2.1, PSP 2.2 e PSP 03. Dentre as oito cepas isoladas, quatro apresentaram mais de 60% de degradação de penas, chegando a 80% para a amostra PGSP 01 em condições não otimizadas. A zimografia apresentou perfil de múltiplas bandas de peptidase para todas as cepas testadas, mesmo as cepas PSP 1.1 e PGSP 2.2 que degradaram menos de 10% das penas.

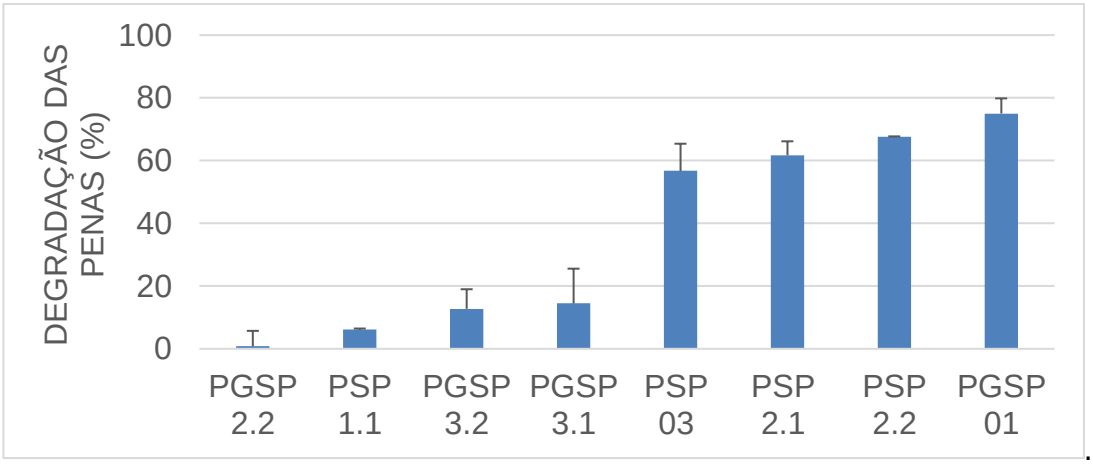


Figura 1. Porcentagem de degradação das bactérias, após 7 dias de cultivo em meio penas.

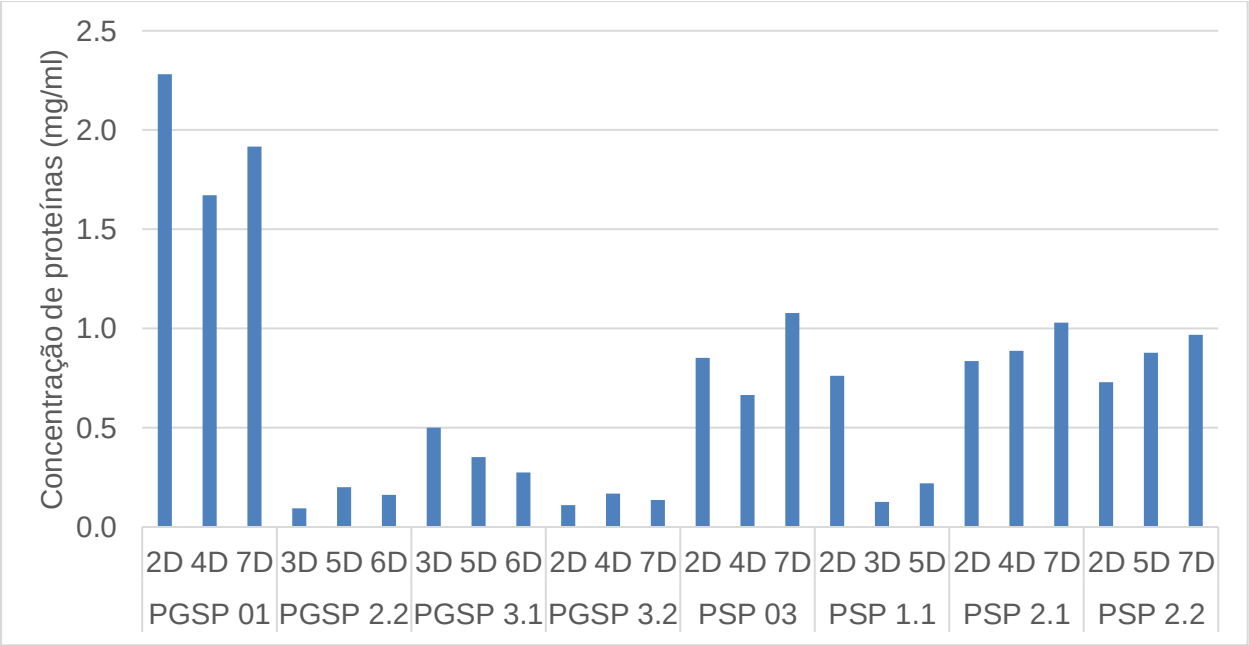


Figura 2. Concentração de proteínas no sobrenadante de cultura dos isolados de solo após 7 dias de cultivo em meio contendo 1% de penas de frango.

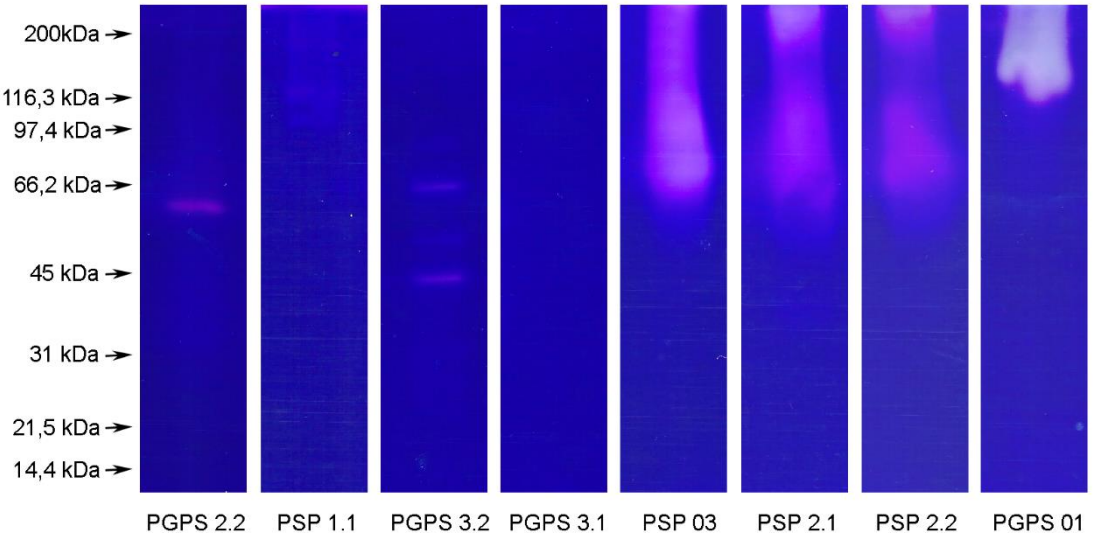


Figura 3. Zimografia com substrato gelatina do sobrenadante de cultura dos isolado de solo após 7 dias de cultivo em meio penas.

4. CONCLUSÕES

O isolamento de microrganismos queratinilóticos de solos contendo queratina e o enriquecimento em meio penas ou pelos antes do plaqueamento levou a obtenção de relativamente poucas cepas, porém, todas produtoras de peptidases e alto aproveitamento de cepas com degradação eficiente de penas A cinética de produção e a otimização das condições de cultivo das amostras, assim como a suas identificações, serão as próximas etapas do projeto.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Artigo

Allpress JD, Mountain G, Gowland PC. Production and characterization of an extracellular keratinase from *Lysobacter* NCIMB 9497. **Letters in Applied Microbiology**, 34, 337-342. 2002

Brandelli A, Daroit DJ, Riffel A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, 85, 1735–1750. 2010

Onifade AA, Al-Sane NA, Al-Musallan AA, Al-Zarban SA. Review: A potential for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resource. **Bioresource Technology**, 66, 1-11. 1998

Sharma R, Devi S. Versatility and commercial status of microbial keratinases, a review. **Rev Environ Sci Biotechnol**,17,19–45. 2018

Lowry OH, Rosembrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, 193: 267- 275. 1951

Mazotto AM, De Melo ACN, Macrae A, Rosado AS, Peixoto R, Cedrola SML, Couri S, Zingali RB, Villa ALV, Rabinovitch L, Chaves JQ, Vermelho AB. Biodegradation of feather waste by extracellular keratinases and gelatinases from *Bacillus* spp. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, 27,1355-65. 2011

Tese/Dissertação/Monografia

Mazotto, AM **Queratinases de *Bacillus* sp.: produção, caracterização e aplicação biotecnológica.** 2012. Tese (Doutorado) – Ciências (Microbiologia), Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Documentos eletrônicos

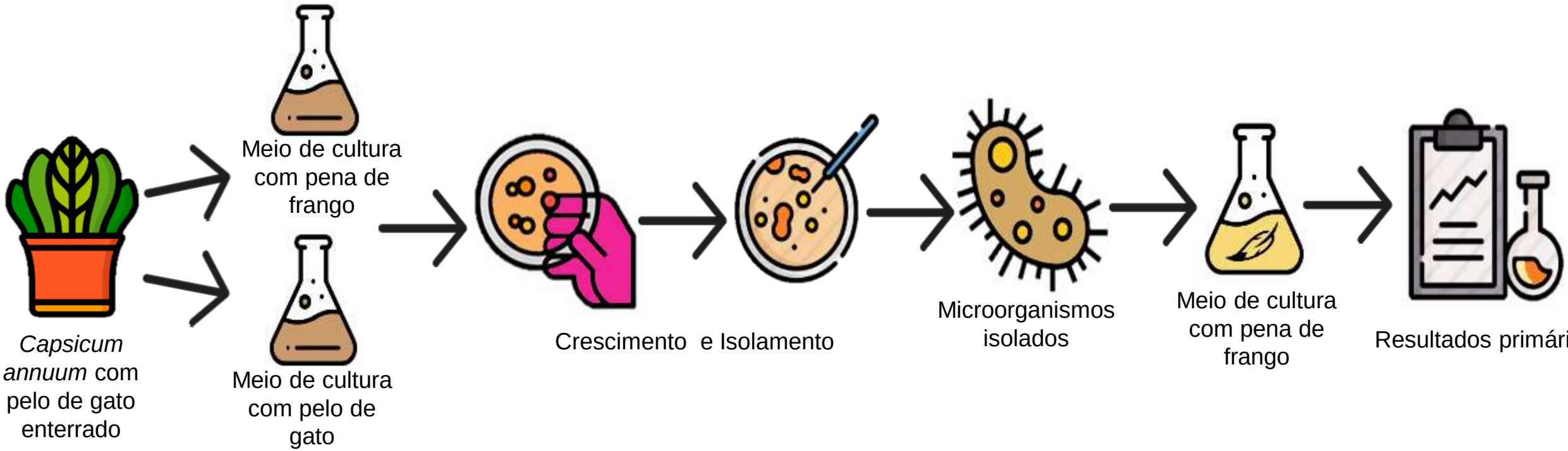
Avisite. **Estatísticas & Preços.** 2018. Acessado em 11 ago. 2020. Disponível em: https://www.avisite.com.br/index.php?page=estatisticaseprecos&acao=carnefrango

ABPA. **Associação Brasileira de Proteína Animal**. Relatório anual. 2017. Acessado em 11 ago. 2020. Disponível em: http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2017

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS QUERATINOLÍTICOS PARA UTILIZAÇÃO EM PROCESSO FERMENTATIVO DE HIDRÓLISE DE RESÍDUOS AVÍCULAS

LARISSA APARECIDA ALMEIDA DE BRITO[1]; ANA MARIA MAZOTTO DE ALMEIDA[2]



ANÁLISE ECOLÓGICA E EPIDÊMICA DO COVID-19 NA PARAÍBA

LAURA MARIA DE ARAÚJO PEREIRA[1];
JOSÉ GUEDES DA SILVA JÚNIOR[2]

[1]Faculdade Maurício de Nassau 1 – lauramaricota93@gmail.com
[2]Universidade Federal de Pernambuco 2 – zeguedescrizart@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

No final de 2019, autoridades chinesas informaram a Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre um surto viral que estava acontecendo em seu território, o qual, foi denominado temporariamente como *2019-nCov* e respectivamente, recebeu o nome definitivo de *Sars-Cov-2*. Dias após, o vírus já estava sendo disseminado em grande maioria dos países do mundo.

Segundo o ritmo de contaminação mundial, no dia 18 de março, a Secretaria Estadual da Saúde da Paraíba recebeu o exame de confirmação do primeiro caso de Covid-19 no estado. Tratava-se de um homem de 60 anos, que reside na capital, João Pessoa, com histórico de viagem para Europa, retornando ao Brasil no dia 29/02. Este paciente foi atendido pelo setor privado, esteve em isolamento domiciliar e, felizmente, se recuperou. Nesse momento, haviam 529 casos confirmados em todo o Brasil, segundo o Ministério da Saúde.

Portanto, o objetivo deste estudo foi analisar o elevado grau de contágio do vírus e sua mortalidade, além de evidenciar as condutas tomadas pela Secretaria Estadual de Saúde da Paraíba em tempos de pandemia.

2. METODOLOGIA

Trata-se de um estudo ecológico e epidemiológico, cujas analises foram feitas mensalmente entre os números de contaminados, recuperados e mortes, construídas sob os dados do estado da Paraíba. Utilizaram-se os coeficientes de incidência e disseminação do Covid-19 no estado. A estimativa oficial da contaminação da Paraíba, bem como unidade federativa, foi obtida pela Secretaria Estadual, em agosto de 2020. Todos os dados que foram utilizados são secundários, sem identificação pessoal e de domínio público, o que conforme a Resolução nº 510/2016, do Conselho Nacional de Saúde, dispensa a necessidade prévia de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estado da Paraíba possui população de 4.068.941 habitantes projetada para o ano de 2020 (com predominância populacional concentrada na capital João Pessoa e em Campina Grande) com a densidade demográfica de 72,06 habitantes/km2 e IDHM de 0,722 (2017), considerado alto. Desse modo, no

primeiro dia de abril de 2020, estavam confirmados 21 casos e 1 óbito, tendo como coeficiente de incidência 0,02 por 100 mil habitantes, sendo João Pessoa o município com a maior incidência, somando 15 casos.

Os dados de todos os municípios com casos na primeira coleta foram sumarizados pela Secretaria de Saúde do Estado da Paraíba. Os demais meses de junho, julho e agosto serão postos respectivamente (Gráfico 1).

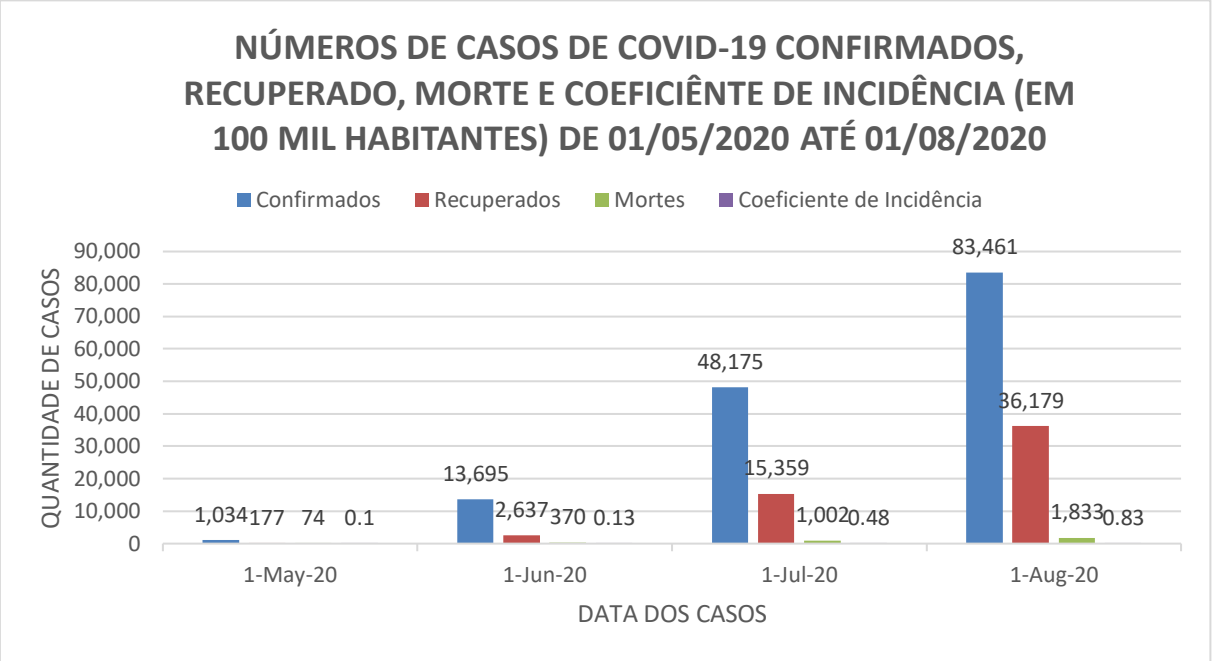


Gráfico 1. Número de casos confirmados, recuperados, mortes e coeficiente de incidência na Paraíba causados pela Covid-19 de 01 de maio até 01 de agosto de 2020.

Sendo assim, as principais medidas tomadas pela a Secretaria de Saúde da Paraíba para o combate da pandemia foram a contratação de profissionais de saúde, a ampliação de leitos, aquisição de testes rápidos para alta testagem da população e abertura de novos hospitais.

Na perspectiva socioeconômica, é importante ressaltar que a população idosa representa um dos grupos mais sujeitos à sintomatologia e letalidade por Covid-19, com risco dessa *causa mortis* mais elevados para homens e a partir da sétima década de vida, na China e Estados Unidos. A pandemia provocada por Covid-19 colocou metrópoles em alerta, especialmente as grandes, pois, apresentam altas densidades a propagação da doença, como pode ser observado no alto coeficiente de incidência em São Paulo, Rio de Janeiro, Manaus e Fortaleza, além de municípios circunvizinhos. Embora as medidas tomadas pela gestão estadual contribuam para limitar a velocidade de ocorrências, a Paraíba teve explosão de casos de Covid-19 entre o começo do mês de julho para agosto.

O vírus já circula nas periferias das cidades, com áreas de grande densidade populacional e piores relações sanitárias, o que aumenta a preocupação com a rapidez do contagio. A região metropolitana de João Pessoa é geradora de renda e serviços, polo turístico, possui alta densidade demográfica e mobilidade urbana. Embora o tráfego aéreo internacional seja mais intenso na Região Sudeste, que recebe a maioria de viajantes provenientes dos Estados Unidos, da França e da Itália, o aeroporto de João Pessoa constitui um potente *hub* nacional para a Europa. Esse conjunto de fatores pode corroborar o presente estudo, sugerindo que um maior índice de incidência também pode facilitar as condições de circulação viral intensa, transmissibilidade e recrudescimento do quadro clínico de Covid-19.

Apesar da Paraíba apresentar taxa de letalidade de 0,02% em relação à sua população, o que equivale à décima posição de óbitos pelo Covid-19 do país, o estado é o décimo quinto no Brasil com maior subnotificação de Covid-19, na ordem de 2.134 casos estimados.

4. CONCLUSÕES

O estudo é válido ao demonstrar a necessidade de articulação de serviços de vigilância epidemiológica em serviços de saúde privada com o Sistema Único de Saúde (SUS), os primeiros mais buscados por grupos populacionais com maior poder aquisitivo. Os achados contribuem para o conhecimento acerca do processo epidêmico de Covid-19 no estado da Paraíba, assim como abrem caminho para análises constantes que indiquem o comportamento da doença.

A transparência de dados advindos da Secretaria de Saúde do Estado da Paraíba possibilitou essa análise e a discussão sobre aspectos sociais e a ocorrência de Covid-19 no estado, gerando produtos que possibilitem o planejamento de ações mais efetivas, coerentes e resolutivas aos problemas que interferem negativamente no processo saúde-doença vivenciado pela população.

Conclui-se que a ocorrência do coeficiente de incidência de Covid-19 foi desigualmente distribuída nos municípios do estado da Paraíba e deve ser associada ao IDHM. O mapeamento desigual de Covid-19 e sua relação com o IDHM da Paraíba podem contribuir com ações de enfrentamento regional à pandemia.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Centro de Operações de Emergências em Saúde Pública. Doença pelo novo coronavírus 2019 – COVID-19. Boletim Epidemiológico [Internet] 2020 [acessado em 20 jul. 2020]. Disponível em:

https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/ pdf/2020/fevereiro/21/2020-02-21-BoletimEpidemiologico03.pdf

Zhong BL, Luo W, Li HM, Zhang QQ, Liu XG, Li WT, et al. Knowledge, attitudes, and practices towards COVID-19 among Chinese residents during the rapid rise period of the COVID-19 outbreak: a quick online cross-sectional survey. Int J Biol Sci 2020; 16(10): 1745-52. http://doi.org/10.7150/ ijbs.45221

Carvalho MS, Souza-Santos R. Análise de dados espaciais em saúde pública: métodos, problemas, perspectivas. Cad Saúde Pública 2005; 21(2): 361-78. http://doi.org/10.1590/s0102-311x2005000200003

Brasil. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Boletim Ética em Pesquisa - Edição Especial Coronavírus (Covid-19). Versão 8.0 [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2020 [acessado em 23 jul. 2020]. Disponível em: https:// conselho.saude.gov.br/images/comissoes/conep/ img/boletins/Boletim-%C3%89ticaemPesquisa-ED4- EstudosAprovados-Coronav%C3%ADrus.pdf

Brasil. Ministério da Saúde. Painel Coronavírus. SRAG Casos por região [Internet]. 2020 [acessado em 23 jul. 2020]. Disponível em: Disponível em: http://covid.saude.gov.br [Links]

Garcia LP, Duarte E. Intervenções não farmacológicas para o enfrentamento à epidemia da COVID-19 no Brasil. Epidemiol Serv Saúde 2020; 29(2): 1-4. http://doi.org/10.5123/S1679-49742020000200009 [Links]

Lancet. Redefining vulnerability in the era of COVID-19. Lancet 2020; 395. http://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30757-1 [Links]

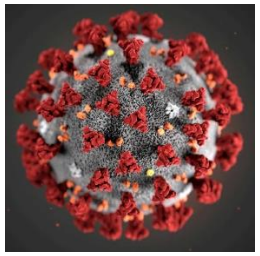
Vale D, De Morais CMM, Pedrosa L de FC, Ferreira MÂF, Oliveira ÂGR da C, Lyra C de O. Spatial correlation between excess weight, purchase of ultra-processed foods, and human development in Brazil. Ciênc Saúde Coletiva 2019; 24(3): 983-96. http://doi.org/10.1590/1413-81232018243.35182016 [Links]

The Novel Coronavirus Pneumonia Emergency Response Epidemiology Team. Vital Surveillances: The Epidemiological Characteristics of an Outbreak of 2019 Novel Coronavirus Diseases (COVID-19) - China, 2020. Chinese CDC Weekly [Internet] 2020 [acessado em 21 Jul. 2020]; 2(8): 113-22. Disponível em: Disponível em: http://weekly.chinacdc.cn/en/article/id/e53946e2-c6c4-41e9-9a9b-fea8db1a8f51?utm_source=TrendMD&utm_medium=cpc&utm_campaign=China_CDC_Weekly_TrendMD_1 [Links]

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

ANÁLISE ECOLÓGICA E EPIDÊMICA DO COVID-19 NA PARAÍBA

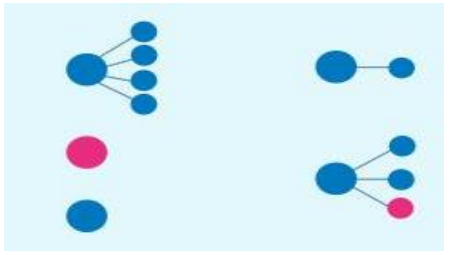
LAURA MARIA DE ARAÚJO PEREIRA[1];
JOSÉ GUEDES DA SILVA JÚNIOR[2]



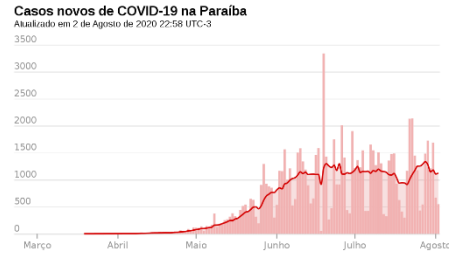
Sars-Cov-2



Declaração da Organização Mundial da Saúde



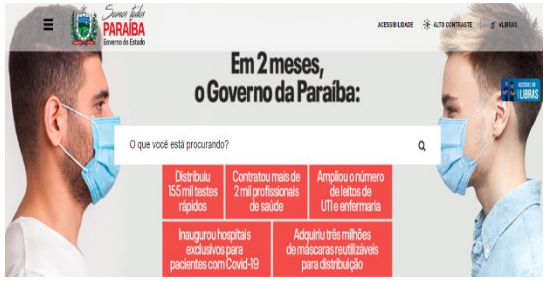
Cadeia de transmissão



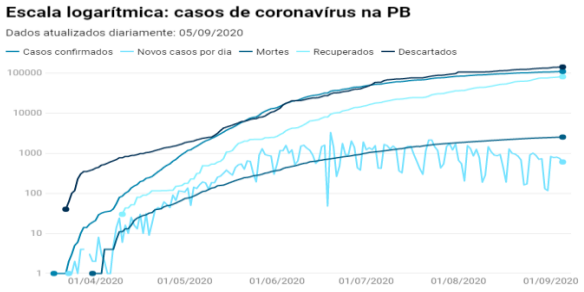
Casos diários de contaminação na Paraíba



Óbitos pelo Covid-19 na Paraíba



Medidas adotadas pela Secretaria Estadual de Saúde



Diminuição do índice de contaminação e mortalidade

RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM *Staphylococcus aureus* PROVENIENTES DE SURTOS DE INTOXICAÇÃO ESTIFOLOCÓCICA

LUIZ GUSTAVO BACH[1]; LISSETH PAMELA PERALTA CANCHIS[2]; LAÍS ABREU ANASTÁCIO[3]; DIEGO PERES ÁVILA[4]; ISABELA SCHNEID KRONING[5]; WLADIMIR PADILHA DA SILVA[6]

[1]*Universidade Federal de Pelotas 1 – lugubach@hotmail.com*
[2] *Universidade Federal de Pelotas –lpc_07@hotmail.com*
[3] *Universidade Federal de Pelotas - laisabr@gmail.com*
[4] *Universidade Federal de Pelotas-diiperes1@gmail.com*
[5] *Universidade Federal de Pelotas- isabelaschneid@gmail.com*
[6] *Universidade Federal de Pelotas- wladimir.padilha2011@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é uma bactéria patogênica capaz de produzir enterotoxinas em alimentos, as quais, ao serem ingeridas, resultam em intoxicação alimentar estafilocócica (HENNEKINNE et al., 2012).

No Brasil, *S. aureus* está entre os dez maiores causadores de surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA), representando 9,5% das notificações entre 2009 e 2018. Já nos Estados Unidos da América, no ano de 2017, as intoxicações estafilocócicas causaram 12 surtos, o que corresponde a 2% do total desses eventos no ano (CDC, 2017).

A utilização de antimicrobianos no tratamento de humanos e animais nos últimos anos foi realizada de forma inadequada, o que favoreceu o surgimento de isolados resistentes (GEBREYES et al, 2017). Exemplos importantes são *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) e ainda isolados multirresistentes, caracterizados pela resistência a três ou mais classes de antimicrobianos (DUARTE et al., 2018)

Segundo WITTE (2000), genes de resistência, presentes no cromossomo ou em plasmídeos de micro-organismos, são uma das principais formas de resistência aos antimicrobianos. Esse é um fato importante, uma vez que bactérias possuem mecanismos de transferência de material genético, como por exemplo, a conjugação. Nesse processo há a transferência de plasmídeos de uma bactéria para a outra, e dessa forma, genes de resistência plasmidiais podem ser transferidos entre micro-organismos de mesma espécie ou até entre micro-organismos de espécies diferentes (HAABER et al., 2017).

Sendo assim, esse estudo teve como objetivo avaliar fenotipicamente e genotipicamente o perfil de resistência a antimicrobianos em isolados de *S. aureus* oriundos de surtos de intoxicação alimentar ocorridos no sul do Brasil.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Treze isolados de *S. aureus* provenientes de surtos de intoxicação alimentar ocorridos no sul do Brasil, disponíveis na coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de alimentos do Departamento de Ciência e

Tecnologia Agroindustrial/DCTA/FAEM/UFPel, foram selecionados para a avaliação fenotípica e genotípica de resistência a antimicrobianos.

Os isolados foram submetidos ao teste de disco difusão em ágar, preconizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (2012), utilizando-se 16 antimicrobianos: penicilina (10 U), ampicilina (10 µg), oxacilina (1 µg), cefoxitina (30 µg), clindamicina (2 µg), eritromicina (15 µg), claritromicina (15 µg), estreptomicina (10 µg), amoxicilina + ácido clavulânico, tetraciclina (30 µg), vancomicina (30 µg), imipenen (10 µg), sulfazotrim (25 µg), gentamicina (10 µg), sulfonamina (300 µg), minociclina (30 µg), adquiridos da Laborclin® (Brasil). Os resultados foram interpretados de acordo com as normas CLSI (2016). Utilizou-se, como controle positivo para os testes, a cepa *S. aureus* ATCC 25923.

A extração do DNA genômico foi realizada segundo o protocolo descrito por GREEN et al. (2012), com adaptações. Após a quantificação do DNA, a amostra foi submetida à técnica de PCR em termociclador MJ Research PTC 100. Foram avaliados os genes que codificam a resistência aos macrolídeos (*ereB, ermB, ermC*), tetraciclinas (*tetA, tetB, tetK, tetL, tetM* e *tetO*), inibidores da síntese de folato (*sul1, sul2, dfrG*) e ß-lactâmicos (*blaZ* e *mecA*). Para cada reação, foram adicionados 12,5 µL de 2x GoTaq® Green Master Mix (Promega), 1 µL de cada oligonucleotídeo, 2 µL de DNA (20 ng) e água ultrapura para completar o volume final de 25 µL. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e visualizados em transiluminador (Loccus®).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os isolados foram resistentes à penicilina e ampicilina, quatro foram resistentes à sulfonamida (30,76%), e apenas o isolado 7 foi resistente a eritromicina, claritromicina, tetraciclina e minociclina (7,69%) (Tabela 1). Simultaneamente, foi observada resistência intermediária à eritromicina e claritromicina (38,46% e 30,46%, respectivamente) e multirresistência, caracterizada pela resistência a três ou mais classes de antimicrobianos, em 30,76% (isolados 4, 5, 6 e 7).

Em relação à detecção de genes de resistência (Tabela 1), o gene *blaZ,* que confere resistência a beta-lactâmicos, foi identificado em 76,9% (10/13) dos isolados. O gene *ereB,* envolvido na resistência a macrolídeos, foi detectado em 23,07% (3/13) dos isolados, enquanto o gene *sul2,* que provoca a inibição da síntese de folato, em 15,38% (2/13) dos isolados. Já os genes *tetK* e *ermB,* os quais conferem resistência a tetraciclinas e macrolídeos, só foram detectados nos isolados 12 e 13, respectivamente (7,69%).

JAMALI et al. (2015) também avaliaram o perfil fenotípico e genotípico de resistência a antimicrobianos em 328 isolados de *S. aureus* provenientes de amostras de leite cru e queijo. Os autores verificaram que 47,3% (155 isolados) foram resistentes à penicilina, sendo que o gene *blaZ* foi detectado em 97,4% (151 isolados). Vinte e seis isolados (7,9%) foram resistentes à eritromicina, dos quais, 12 (42,6%) portavam o gene *ermB* e 18 isolados (69,2%) carreavam o gene

ermC). Além disso, 184 isolados (56,1%) foram resistentes à tetraciclina, dos quais, 64 (34,8%) portavam o gene *tetM.*

Tabela 1: Perfil de resistência fenotípica e genotípica em isolados de *S. aureus* provenientes de surtos de intoxicação estafilocócica

Isolado	Resistência fenotípica	Resistência intermediária	Resistência genotípica
1	PEN, AMP	SUT	*blaZ, sul2, ereB*
2	PEN, AMP		*blaZ, ermB*
3	PEN, AMP	ERI, CLA	*blaZ*
4	PEN, AMP, SUL		*blaZ*
5	PEN, AMP, SUL		*blaZ*
6	PEN, AMP, SUL		
7	PEN, AMP, SUL, ERI,CLA, TET, MIN		*blaZ*
8	PEN, AMP	ERI	*blaZ*
9	PEN, AMP	ERI	
10	PEN, AMP	ERI, CLA	*blaZ*
11	PEN, AMP		*blaZ, ereB,*
12	PEN, AMP		*tetK*
13	PEN, AMP	ERI, CLA	*blaZ,sul2,ereB,*

Ampicilina 10 µg (AMP); Claritromicina 15 µg (CLA); Eritromicina 15 µg (ERI), Minociclina 30 µg (MIN); Penicilina G 10U (PEN); Sulfazotrim 25 µg (SUT); Sulfonamida 300 µg (SUL); Tetraciclina 30 µg (TET) .

Os resultados deste estudo estão em concordância com os obtidos por DA COSTA et al. (2018), que também encontraram 100% de resistência à penicilina em 15 isolados de *S. aureus* obtidos de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*).

Quatro isolados (30,76%) avaliados neste estudo (isolados 4, 5, 6 e 7) foram multirresistentes, o que é um resultado muito relevante. SOUZA (2007), por exemplo, descreve que micro-organismos multirresistentes a antimicrobianos são um problema de saúde pública, pois limitam as opções de princípios ativos a serem utilizados, bem como facilitam a disseminação de genes de resistência entre micro-organismos, dificultando o seu controle.

4. CONCLUSÃO

Isolados de *S. aureus* obtidos de surtos de intoxicação estafilocócica ocorridos no sul do Brasil apresentam resistência a β-lactâmicos, macrolídeos, tetraciclinas e sulfonamidas. Além disso, a presença de isolados multirresistentes reforça a necessidade de mais estudos utilizando esses isolados, verificando o seu perfil plasmidial e possível potencial conjugativo, a fim de caracterizar melhor essas resistências.

5. REFERÊNCIAS

BRASIL. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Disponível em: https://www.saude.gov.br/images/pdf/2019/maio/17/Apresentacao-Surtos-DTA-Maio-2019.pdf Acessado em: 25 de jul. 2020.

CLSI. CLSI Supplement M100S. 26th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**, 2016.

CDC (Center for Disease Control and Prevention). **Surveillance for Foodborne Diseade Outbreaks United States, 2017: Annual Report**. Disponivel em: https://www.cdc.gov/fdoss/pdf/2017_FoodBorneOutbreaks_508.pdf. Acessado em: 25 jul. 2020.

DUARTE, F. C.; DANELLI, T.; RIBEIRO, M. A. G.; PERUGINI, L. F.; VESPERO, E. C.; CARRARA-MARONI, F. E.; PELISSON, M.; YAMAUCHI, L. M.; YAMADA-OGATA, S.F.; PERUGINI, M. R. E. Bacteremia causada por *Sthapylococcus aureus.* Uma análise de quinze anos de sensibilidade a antimicrobianos em um hospital terciário do Brasil. **Revista de Epidemiologia e Infecção Hospitalar**. v. 8, n.3, 2018.

GEBREYES, W. A.; WITTUM, T.; HABING, G .; ALALI, W.; USUI, M.; SUZUKI, S. Spread of antibiotic resistance in food animal production systems. In: **Foodborne diseases Academic Press**. p.105-130, 2017.

GREEN, M. R.; SAMBOOK, J. Cold Spring Harbor Laboratory. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**: Three- Volume Set, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.

HENNEKINNE, J.A.; BUYSER, M. L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**. v.36, n.4, p.815-836, 2012.

HAABER, J.; PENADÉS, J. R.; INGMER, H. Transfer of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Trends in microbiology**, v. 25, n. 11, p. 893-905, 2017.

JAMALI, H.; PAYDAR, M.; RADMEHR, B.; ISMAIL, S.; DADRASNIA, A. Prevalence and antimicrobial resistence of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. **Food Control**, v. 54, p. 383-388, 2006.

SANTANA, E. H. W. **Determinação do perigo de consumo do leite cru relacionado a intoxicação estafilocócica.** Londrina, PR. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Londrina- UEL, 2006.

SOUZA, C. M. M. Representações sociais das implicações legais da infecção hospitalar e de seu controle. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Brasília, v. 60, n. 4, 2007.

WITTE, W. E. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 14, n. 4, p. 321-325, 2000.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM *Staphylococcus aureus* PROVENIENTES DE SURTOS DE INTOXICAÇÃO ESTIFOLOCÓCICA

LUIZ GUSTAVO BACH[1]; LISSETH PAMELA PERALTA CANCHIS[2]; LAÍS ABREU ANASTÁCIO[3]; DIEGO PERES ÁVILA[4]; ISABELA SCHNEID KRONING[5]; WLADIMIR PADILHA DA SILVA[6]

13 ISOLADOS
Staphylococcus aureus



DISCO DIFUSÃO EM ÁGAR
16 antimicrobianos



PCR
14 primers



RESISTÊNCIA

- Penicilina e Amipicilina: 100%
- Eritromicina, Claritromicina, Minocilina, Tetraciclina: 7,69%
- Sulfonamida: 30,76%

RESISTÊNCIA INTERMEDIÁRIA

- Eritromicina: 38,46%
- Claritromicina: 30,46%

GENES DE RESISTÊNCIA

- *ereB*: 23,07%
- *blaZ*: 76, 90%
- *ermB*: 7,69%
- *sul2* : 14,38%
- *tetK*: 7,69%

FORMAÇÃO DE BIOFILME PELAS BACTÉRIAS *Acinetobacter baumannii* E *Pseudomonas aeruginosa*

MIRIAN ELERT DA SILVA[1]; MARCELLE OLIVEIRA GARCIA[2]; DÉBORAH TROTA FARIAS DE ALBERNAZ[3]; RODRIGO YUDI ISHIKAME[4]; DAIANE DRAWANZ HARTWIG[5]

[1]Universidade Federal de Pelotas - mirian.elert@gmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas - marcelle_garcia@hotmail.com
[3]Universidade Federal de Pelotas - debstrota@gmail.com
[4]Universidade Federal de Pelotas - rodrigo_y_i@hotmail.com
[5]Universidade Federal de Pelotas - daianehartwig@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As infecções bacterianas continuam sendo um grande desafio à saúde pública, sendo responsáveis por significativa morbimortalidade em hospitais mundialmente (HUGHES; WEBBER, 2016). Esse problema se agrava devido à resistência bacteriana, pois os patógenos se tornam multirresistentes aos antibióticos convencionais, o que pode se agravar quando há capacidade de formar biofilmes (PIDDOCK, 2016).

Biofilmes são comunidades de micro-organismos compostas por uma ou mais espécies aderidas a um substrato embebido por uma matriz de polímeros extracelulares, denominados de exopolissacarídeos (EPS). A organização em biofilmes torna as células bacterianas menos suscetíveis aos antimicrobianos e também à morte por mecanismos imunológicos do hospedeiro (HA; O'TOOLE, 2015; HALL; MAH, 2017; DEL POZO, 2017). As bactérias com a capacidade de formar biofilme são mais resistentes a antibióticos em comparação a outros micro-organismos, tornando-se ainda mais problemáticas as contaminações e infecções hospitalares (MIHAI et al., 2015; RABIN et al., 2015).

Acinetobacter baumannii e Pseudomonas aeruginosa são exemplos de patógenos oportunistas responsáveis por diversas infecções nosocomiais graves, incluindo pneumonias, bacteremias e infecções no trato urinário. Um dos fatores que contribuem para a sua resistência e persistência em infecções é a capacidade de colonizar e formar biofilme (THUMMEEPAK et al., 2016; MAURICE et al., 2018). Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade de formação de biofilme por cepas padrão e isolados clínicos de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*.

2. METODOLOGIA

Para as análises microbiológicas foram utilizadas as cepas padrão de *A. baumannii* ATCC 19606 e *P. aeruginosa* ATCC 27853, bem como, 6 isolados clínicos de *A. baumannii* (Ab02, Ab03, Ab10, Ab13, Ab15 e Ab47) e 3 isolados de *P. aeruginosa* (Pa02, P03 e Pa04) confirmados bioquímica e fenotipicamente.

Os micro-organismos foram classificados quanto a sua capacidade de formar biofilme de acordo com STEPANOVIĆ et al. (2007). Para o ensaio, foram utilizadas microplacas com 96 cavidades, nas quais foram adicionados 180µL de caldo *Trypticase Soy Broth* (TSB). Posteriormente, foram adicionados aos poços, 20µL do inóculo bacteriano na concentração de 1 x 10^6 UFC/mL, exceto nos poços controle, nos quais foram colocados apenas 200µL de TSB. A placa foi incubada em estufa à 37ºC durante 24 horas.

Após o período de incubação, foi descartado o conteúdo contendo as células planctônicas e os poços foram lavados com solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9% (solução salina). Para a fixação do biofilme, foram adicionados posteriormente a lavagem, 200µL de metanol por 20 min, e então, as microplacas foram secas por 16-18h, a temperatura ambiente. A seguir, as cavidades foram coradas com 200µL de cristal violeta a 0,5% por 15 min, e logo os poços foram lavados cuidadosamente com solução salina até ser retirado totalmente o excesso do corante. A placa foi levemente seca com papel toalha absorvente e, posteriormente, foram adicionados 200µL de álcool etílico 95%, durante 30 minutos. Após isso, foi realizada a leitura da densidade óptica a um comprimento de onda de 540nm (DO_{540}) dos biofilmes bacterianos com o auxílio de um espectrofotômetro. Em seguida, as cepas foram classificadas como: não formadora de biofilme ($DO_{biofilme} \leq DO_{controle}$), fraca formadora de biofilme ($DO_{controle} < DO_{biofilme} \leq 2xDO_{controle}$), moderada formadora de biofilme ($2x\ DO_{controle} < DO_{biofilme} \leq 4x\ DO_{controle}$) e forte formadora de biofilme ($4x\ DO_{controle} < DO_{biofilme}$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo, referente a capacidade de formação de biofilme, estão apresentados na tabela 1. *A. baumannii* ATCC 19606 apresentou maior capacidade de formação de biofilme, quando comparado com a cepa padrão de *P. aeruginosa* ATCC 27853. O mesmo pode ser observado quando analisamos os isolados das duas espécies, pois todos os isolados de *A. baumannii* foram classificados como fortes formadores de biofilme, ao contrário dos isolados de *P. aeruginosa*, que dos 3 isolados testados apenas um (Pa04) mostrou-se forte formador de biofilme, enquanto os demais foram não formadores de biofilme.

ZEIGHAMI et. al., (2019) testando 100 isolados de *A. baumannii* observaram que todos os isolados foram capazes de formar biofilme, sendo 42 isolados moderados formadores e 58 na classificação de fortes formadores. Resultados semelhantes foram observados por BABAPOUR et al., (2016), que, utilizando o método de microdiluição em placas, testou 650 amostras clínicas, sendo 156 isolados de *A.baumannii,* obtendo a classificação de 3 isolados como não formadores de biofilme, 49 fracos formadores, 91 moderados

formadores e 13 fortes formadores de biofilme. Segundo YOUN-SUNG (2018), a taxa de formação de biofilme em *A. baumannii* é de 80-90%, sendo assim, maior que de outras espécies (5-24%).

Tabela 1. Capacidade de formação de biofilme por cepas padrão e isolados clínicos de *A. baumannii* e *P. Aeruginosa*.

Isolados	Capacidade de formação de Biofilme			
	Não formador de biofilme	Fraco formador de biofilme	Moderado formador de biofilme	Forte formador de biofilme
A. baumannii ATCC 19606				X
P. aeruginosa ATCC 27853	X			
Ab-02				X
Ab-03				X
Ab-10				X
Ab-13				X
Ab-15				X
Ab-47				X
Pa-02	X			
Pa-03	X			
Pa-04				X

Diferente dos resultados obtidos nesse estudo, KARAMI et. al, (2019) testando 58 isolados clínicos de *P. aeruginosa,* obteve a classificação de forte formador de biofilme para 35 isolados e 3 para não formadores de biofilme. Assim como, ABDELRAHEEM et. al. (2020) testaram 100 isolados de *P. aeruginosa,* tendo como resultado 27 isolados produtores de biofilme, no qual 14 foram classificados como forte formadores de biofilme, 7 moderados e 6 fracos formadores de biofilme. No estudo de ABDELRAHEEM et. al. (2020) foi comparado a formação do biofilme com resistência a uma variedade de antimicrobianos, e observou-se que a resistência a múltiplas drogas foi maior entre cepas produtoras de biofilme do que as que não produzem biofilme.

4. CONCLUSÕES

Todos os isolados clínicos e também a cepa padrão de *A. baumannii* mostraram-se fortes formadores de biofilme. Enquanto que para *P. aeruginosa* a classificação foi de não formador de biofilme para a cepa padrão e isolados, com exceção de Pa04 que se mostrou forte formador de biofilme.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELRAHEEM, W. M.; ADBELKADER, A. E.; MOHAMED, E. S.; MOHAMMED, M. S. Detection of biofilm formation and assessment of biofilm genes expression in different *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **Meta Gene**, v.23, p.7 ,2020.

BABAPOUR, E.; HADDADI, A.; MIRNEJAD, R.; ANGAJI, S. A.; AMIRMOZAFARI, N. Biofilm formation in clinical isolates of nosocomial *Acinetobacter baumannii* and its relationship with multidrug resistance, **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, v. 6, p. 528-533, 2016.**

DEL POZO, J. L. Biofilm-related disease. Expert Review of Anti-infective Therapy, v.15, p. 1-15 ,2017.

HA, D. G.; O'TOOLE, G. A. c-di-GMP and its effects on biofilm formation and dispersion: a *Pseudomonas aeruginosa* review. Microbiology spectrum, v.3, n. 2, 2015.

HALL C. W.; MAH, T.F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, 2017.

HUGHES, G.; WEBBER, M. A. Novel approaches to the treatment of bacterial biofilm infections. **British Journal of Pharmacology**, v. 174; p 2237-2246. , 2016.

KARAMI, P.; KAHLEDI, A.; MASHOOF, R. Y.; YAGHOOBI, M. H.; KARAMI, M.; DASTAN, D.; ALIKHANI, M. Y. The correlation between biofilm formation capability and antibiotic resistance pattern in *Pseudomonas aeruginosa*. **Gene Reports**, v. 18, p. 1-7**,** 2019.

MIHAI, M.M.; HOLBAN, A.M.; GIURCANEANU, C.; POPA, L.G.; OANEA, R.M.; LAZAR, V.; CHIFIRIUC, M.C.; POPA, M.; POPA, I.P.; Microbial biofilms: impact on the pathogenesis of periodontitis, cystic fibrosis, chronic wounds and medical device related infections. **Current Topics in Medicinal Chemistry,** v. 15, p. 1552–1576, 2015.

MAURICE, N.M.; BEDI, B.; SADIKOT, R. T. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Hot Response and Clinical Implications in Lung Infections, **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, p. 1-36 ,2018.

PIDDOCK, L.J.V. Reflecting on the final report of the O0 Neill review on antimicrobial resistance. **Lancet Infect Diseases**, v. 16, p. 767–768, 2016.

RABIN, N.; ZHENG, Y.; OPOKY – TEMENG, C.; DU, S.; BONSU, E.; SINTIM, H. O. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. **Future Medicinal Chemistry**, v.7 (4), p.493-512, 2015

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; HOLA, V.; BONAVENTURA, G. D.; DJUKIĆ, S.; ĆIRKOVIĆ, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci*. **APMIS**, v. 115, n. 8, p. 891-899, 2007.

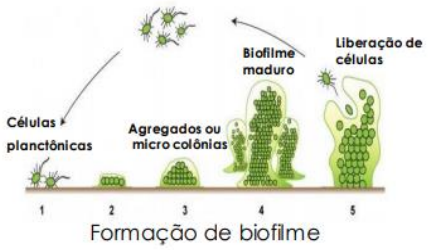
THUMMEEPAK, R.; KONGTHAI, P.; LEUNGTONGKAM, U.; SITTHISAK, S. Distribution of virulence genes involved in biofilm formation in multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **International Journal of Microbiology**, v. 19, n.2, p. 121–9, 2016.

YOUN-SUNG; J. Molecular Characterization and Antimicrobial Susceptibility of Biofilm-forming *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates from Daejeon, **Korean Journal of Clinical Laboratory Science**,v.. 50, 2018.

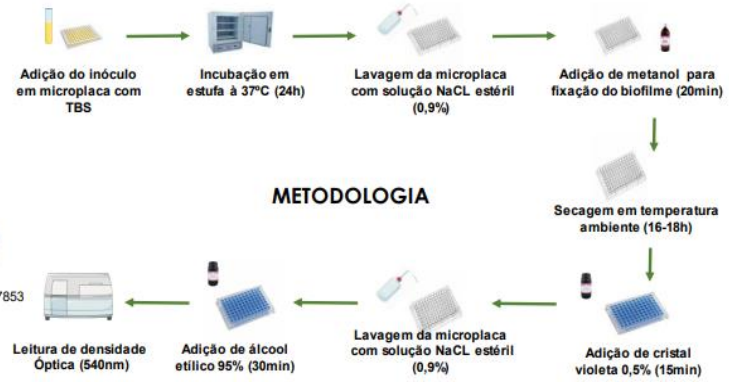
ZEIGHAMI, H.; VALADKHANI, F.; SHAPOURI, R.; SAMADI, E.; HAGHI F. Virulence characteristics of multidrog resistant biofilm forming *Acinetobacter baumanii* isoled from intensive care unit patients. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, p.1-9, 2019.

FORMAÇÃO DE BIOFILME PELAS BACTÉRIAS *Acinetobacter baumannii* E *Pseudomonas aeruginosa*

MIRIAN ELERT DA SILVA[1]; MARCELLE OLIVEIRA GARCIA[2]; DÉBORAH TROTA FARIAS DE ALBERNAZ[3]; RODRIGO YUDI ISHIKAME[4]; DAIANE DRAWANZ HARTWIG[5]



METODOLOGIA



RESULTADOS



METODOLOGIA DE MICROENCAPSULAÇÃO DE LEVEDURA PROBIÓTICA *Saccharomyces boulardii* E SUA APLICAÇÃO EM PETISCO PET

CANDIAGO, NATHALIA TURKOT[1]; GELINSKI, JANE MARY LAFAYETTE NEVES[2]; BARONCELLO, SHEILA[2]; BARATTO, CÉSAR MILTON[3]

[1]Universidade do Oeste de Santa Catarina, Brasil – nathalia.turkot@hotmail.com
[2]UNOESC, Brasil – jgelinski@yahoo.com.br; sheila.baroncello@gmail.com
[3]UNOESC, Brasil – cesar.baratto@unoesc.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Na industrialização de alimentos estão cada vez mais presente os produtos funcionais, também conhecidos como probióticos, e que podem ser consumidos tanto por humanos quanto por animais (FERREIRA, 2012).

Os probióticos para animais são alternativas para o tratamento e prevenção de diarreias, pois possuem microrganismos benéficos que são capazes de eliminar os patogênicos (BATISTA et al., 2008; GUANDALINI, 2011).

Dentro do grupo dos microrganismos benéficos, a levedura probiótica *Saccharomyces boulardii*, tem sido muito utilizada para o tratamento de diarreias e condições inflamatórias do aparelho gastrointestinal (POTHOULAKIS, 2009; FEIZIZADEH; SALEHI-ABARGOUEI; AKBARI, 2014).

Para garantir que o microrganismo probiótico sobreviva ao processo industrial de fabricação e durante a passagem pelo trato gastrointestinal até o intestino, pode-se utilizar a técnica de microencapsulação.

A microencapsulação é uma técnica de empacotamento de materiais, dando origem a pequenas cápsulas que liberarão seu conteúdo de maneira controlada e sob condições específicas (MENEZES et al., 2013). A microcápsula é constituída por um material parede, responsável por proteger a substância ou microrganismo ativos, evitando a exposição inadequada dos mesmos (CARMO; FERNANDES; BORGES, 2015).

A microencapsulação é de extrema importância, porque o público alvo no presente estudo são cães e gatos, e o processo é uma forma de garantir que a levedura chegue ao intestino, de forma viável e tolere as mudanças repentinas de pH, sem que sofra grandes alterações (ALVES, 2013).

Diante do exposto, o objetivo desta pesquisa é desenvolver um método de microencapsulação específico para a levedura probiótica *Saccharomyces boulardii* visando sua utilização em um produto comestível para cães e gatos, estudando a melhor forma de encapsulamento e desempenho, contribuindo para o desenvolvimento de um produto na área de alimentos voltada ao mercado pet.

2. METODOLOGIA

2.1 MICROENCAPSULAÇÃO

Teve como base o estudo desenvolvido por Callone et al. (2008). Três métodos de microencapsulamento foram avaliados.

Metodologia 1: uma cultura de 72 horas a 25ºC em caldo YEG e aerobiose, foi distribuída em 1000µL para tubos eppendorfs e centrifugada duas vezes, por 10 minutos, 4ºC, 7590rcf. Ao pellet final, adicionou-se 500µL de glicerina e 500µL de solução de alginato de sódio 2%, transferindo a mistura para seringa de insulina estéril 1mL. Em solução de $CaCl_2$ 0,1M gotejou-se a mistura pela técnica de extrusão. As microcápsulas foram filtradas em papel filtro e armazenadas em criotubos com solução de 1:1 de água destilada e caldo YEG.
Metodologia 2: pesou-se 1000mg de pó liofilizado de levedura *S. boulardii*, adicionando 3,5mL de glicerina e 3,5mL de solução de alginato de sódio 2%. A mistura foi repassada para seringa estéril descartável 20mL, gotejando em $CaCl_2$ 0,1M por extrusão, seguindo para filtragem. As microcápsulas foram transferidas para pó de quitosana e levemente agitadas para formar a barreira protetora de quitosana.
Metodologia 3: pesou-se em balança analítica 1500mg de levedura liofilizada, acrescentando 3,5mL de glicerina e 3,5mL de solução de alginato de sódio 2%, repassando a combinação para seringa estéril descartável. Pela da técnica de extrusão, gotejou-se em solução de $CaCl_2$ 0,1M, em seguida, realizou-se a filtragem e armazenamento das cápsulas em criotubos com solução de 1:1 de água destilada e caldo YEG.

2.3 AÇÃO DO SUCO GÁSTRICO E INTESTINAL

Utilizou-se como base o método de simulação proposto por Thomas et al. (2014), formulando-se o suco gástrico (pH 2,0) e suco intestinal (pH 8,0).

Em saco plástico estéril, adicionou-se o suco gástrico e uma microcápsula, onde o mesmo permaneceu por 2 horas em homogeneizador. A cada 30 minutos efetuou-se inóculo de 100µL em placas de ágar Saubouraud Dextrose (SD), incubação por 96 horas, 25ºC, aerobiose. Em seguida, a microcápsula foi transferida para de suco intestinal por 45 minutos, e nos tempos 20 e 45 minutos, realizou-se o inóculo de solução em placas de Ágar SD, conforme processo anterior.

2.4 VIABILIDADE DAS MICROCÁPSULAS CONTENDO *Saccharomyces boulardii* EM PETISCO COMESTÍVEL PET

Foram aplicadas em petisco comestível e recheado, 15 microcápsulas contendo leveduras (metodologia 3) e avaliou-se a viabilidade das mesmas no petisco após 15 dias da data de aplicação, realizando inóculo em placas de Ágar YEG. A incubação foi realizada a 25ºC por 96 horas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação aos métodos de microencapsulação, a metodologia de microencapsulamento 1 foi eficiente, porém muito sensível durante o processo de estocagem, tendo seu tamanho significativamente reduzido.

Aprimorando as técnicas, na metodologia 2 utilizou-se cultura em pó de levedura liofilizado e quitosana, sendo a técnica mais eficiente em proteção, entretanto, apesar das condições asséptica, durante a estocagem e análises em ágar SD, a contaminação por fungos foi amplamente detectada em todas as execuções. Conforme Matté e Rosa (2013), a quitosana é muito utilizada na indústria alimentícia por apresentar atividade antimicrobiana, além de ação

antifúngica, contradizendo ao que foi obtido como resultado na presente pesquisa.

Tratando-se do melhor método de microencapsulação, na metodologia 3, com cultura em pó liofilizado de *S. boulardii* em uma concentração maior, obteve-se o melhor resultado em microcápsulas para aplicação em petisco pet. As cápsulas mostraram-se inertes durante o período de estocagem, não apresentando deterioração, isentas de contaminação, medindo 1,5cm de diâmetro. Da mesma forma Mandal, Puniya e Singh (2006) realizaram o encapsulamento de *Lactobacillus casei* com revestimento de alginato de sódio, alegando que a proteção por alginato foi altamente eficiente.

Em relação a ação do suco gástrico e intestinal, os resultados foram satisfatórios, embora tenha havido uma leve liberação de células durante o processo de passagem pelo suco gástrico, o processo com suco intestinal resultou em 5,32 Log10 de colônias viáveis crescidas em placas de ágar SD. A sobrevivência de microrganismos probióticos durante a passagem no sistema digestivo e crescimento no intestino é potencializado pelo processo de microencapsulação, permitindo desenvolver seu potencial probiótico conforme recomendação da Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO, 2001).

A partir de petisco recheado contendo 15 microcápsulas realizou-se contagem das colônias viáveis, resultando em 6,12 x 10^6 UFC viáveis. Conforme a Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2016), o ideal para produtos probióticos é uma densidade entre 10^8 a 10^9 UFC, mas valores menores são aceitos desde que comprovado sua eficácia.

4. CONCLUSÕES

O desenvolvimento da metodologia de microencapsulamento adaptado para levedura liofilizada (metodologia 3) apresentou-se mais eficiente, evitando a maior perda de células. Além disso, as microcápsulas mantiveram-se viáveis durante a simulação do trânsito gastrointestinal, com maior liberação de células no suco intestinal. Possivelmente isso garantirá a eficácia das mesmas em condições reais.

Conforme a aplicação no petisco comestível pet, as células permaneceram viáveis durante o período de estocagem, alcançando uma adequada densidade celular de 6,12 x 10^6 UFC, indicando a eficácia da levedura *Saccharomyces boulardii* microencapsulada no bioproduto.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, Marta Sofia. Microencapsulação de bactérias lácticas com potencial probiótico para produção de pasta de azeitona. 2013. 85 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar/Qualidade Alimentar) – Universidade Nova de Lisboa, 2013.

BATISTA, C. G., et al. Desempenho e saúde de bezerras alimentadas com leite sem resíduo de drogas antimicrobianas ou leite de vacas tratadas contra mastite adicionado ou não de probiótico. Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia, v. 60, n. 1, p. 185-191, 2008

BRASIL: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2016. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/resultado-debusca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=2864062&_101_type=content&_101_groupId=219201&_101_urlTitle=probioticos &inheritRedirect=true. Acesso em 24 de mai de 2019.

CALLONE, Emanuela, et al. Immobilization of yeast and bacteria cells in alginate microbeads coated with silica membranes: procedures, physico-chemical features and bioactivity. Journal of materials chemistry, v.18, n. 40, p. 4839-4848, 2008.

CARMO, Eloá Lourenço do; FERNANDES, Regiane Victória de Barros; BORGES, Soraia Vilela. Microencapsulação por spray drying, novos biopolímeros e aplicações na tecnologia de alimentos. The Journal of Engineering and Exact Sciences, v. 1, n. 2, p. 30-44, 2015.

FAO/WHO. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Prevention, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2001.

FEIZIZADEH, Sahar; SALEHI-ABARGOUEI, Amin; AKBARI, Vajihe. Efficacy and safety of Saccharomyces boulardii for acute diarrhea. Pediatrics, v. 134, n. 1, p. 176-191, 2014.

FERREIRA, Célia Lúcia de Luces Fortes. Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção. Editora Rubio, 2012. Disponível em: https://books.google.com.br/books?hl=ptPT&lr=&id=kcfDAwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=probioticos+para+animais&ots=j1Y5sNz8qj&sig=kndAJRNg26DmxNj6A8ORrrzVMEc#v=onepage&q=probioticos%20para%20animais&f=false. Acesso em 24 de mai de 2019.

GUANDALINI, Stefano. Probiotics for prevention and treatment of diarrhea. Journal of clinical gastroenterology, v. 45, p. 149-153, 2011.

MANDAL, S.; PUNIYA, A. K.; SINGH, K. Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated Lactobacillus casei NCDC-298. International Dairy Journal, v. 16, n.10, p. 1190-1195, 2006.

MATTÉ, Grasiele M.; ROSA, S. A tecnologia da microencapsulação através das microesferas de quitosana. Revista Iberoamericana de Polímeros, v. 14, n. 5, p. 206-218, 2013.

MENEZES, Cristiano Ragagnin de, et al. Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. Ciência Rural, v. 43, n. 7, 2013.

POTHOULAKIS, C. Anti-inflammatory mechanisms of action of Saccharomyces boulardii. Alimentary pharmacology & therapeutics, v. 30, n. 8, p. 826-833, 2009.

THOMAS, Midhun Ben, et al. Enhanced viability of probiotic Saccharomyces boulardii encapsulated by layer-by-layer approach in pH responsive chitosan–dextran sulfate polyelectrolytes. Journal of Food Engineering, v. 136, p. 1-8, 2014.

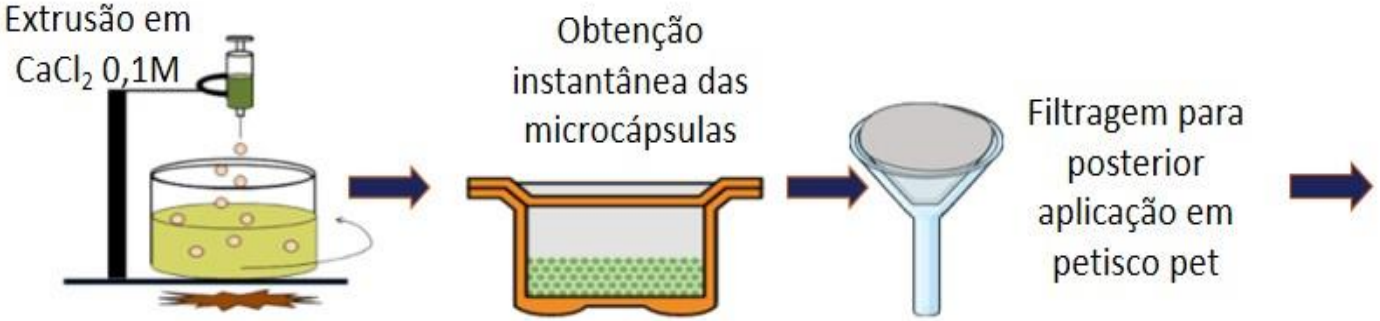
VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

METODOLOGIA DE MICROENCAPSULAÇÃO DE LEVEDURA PROBIÓTICA *Saccharomyces boulardii* E SUA APLICAÇÃO EM PETISCO PET

CANDIAGO, NATHALIA TURKOT[1]; GELINSKI, JANE MARY LAFAYETTE NEVES[2]; BARONCELLO, SHEILA[2]; BARATTO, CÉSAR MILTON[3]

METODOLOGIA DE MICROENCAPSULAÇÃO 3: *Saccharomyces boulardii* liofilizada







ANÁLISE DO PERFIL MICROBIANO DE PACIENTES COM PERIODONTITE

RAFAELA ANSILIERO[1]; QUEILA DA LUZ SAMISTRARO [2]; CÉSAR MILTON BARATTO[2]; CLAUDRIANA LOCATELLI[2]; CRISTIAN ANTUNES DE ALMEIDA[2]; JANE MARY LAFAYETTE NEVES GELINSKI[3]

[1]*Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC) – rafaelaansiliero19@gmail.com*
[2] *UNOESC* – samistraro@gmail.com; cesar.baratto@unoesc.edu.br; claudrilocatelli@gmail.com; cristian.antunesdealmeida@gmail.com
[3] *UNOESC* – jgelinski@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A periodontite, também conhecida como doença periodontal (DP), é uma condição clínica inflamatória que afeta o periodonto, ou seja, os tecidos que envolvem e suportam os dentes, como a gengiva, osso alveolar e ligamento periodontal (GAURILCIKAITE; RENTON; GRANT, 2016). Conforme SAMISTRARO (2018), essa complicação é uma das principais causas de perda dentária na população adulta, porém também pode vir a afetar crianças e adolescentes.

A periodontite é iniciada por microrganismos que se aderem na superfície dos dentes e da gengiva, formando o biofilme, o que gera uma inflamação generalizada, que pode vir a progredir da periodontite leve e moderada até a periodontite severa (KINANE; STATHOPOU; LOUPAPAPANOU, 2017). Ademais, o papel dos microrganismos como principal fator etiológico da DP vem ganhando novas perspectivas, justificando a necessidade de pesquisas na área, que elucidem os principais microrganismos associados a progressão da DP (SAMISTRARO, 2018).

Com base no exposto, esta pesquisa possui como objetivo realizar uma investigação bioquímica e molecular da comunidade microbiana de pacientes com periodontite.

2. METODOLOGIA

Foram obtidas amostras bucais de pacientes com saúde periodontal (n = 3), periodontite leve (n= 3), periodontite moderada (n= 6) e periodontite severa (n=6). Os pacientes incluídos no estudo aceitaram participar do projeto e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Seres Humanos-CEP (Protocolo nº CAAE70323117.3.0000.5593).

Após isolamento, os microrganismos foram submetidos a provas bioquímicas e moleculares de análise e identificação. Foram selecionados 19 microrganismos, os quais foram identificados a nível molecular pela técnica de ARDRA e mediante sequenciamento da região do rRNA 16S.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se grande diversidade microbiológica existente na cavidade bucal dos pacientes, mesmo para os indivíduos do grupo controle (saúde

periodontal) cuja carga microbiana média de isolados bacterianos Gram positivos e Gram negativos foi respectivamente de $1{,}82x10^9$ e $1x10^2$ UFC/paciente. Logo, para os pacientes com periodontite a carga microbiana de isolados Gram positivos ficou em 1,7x108 UFC/paciente e carga microbiana para isolados Gram negativos foi de 2,9x107 UFC/paciente.

Embora o número total de microrganismos para pacientes saudáveis tenha sido alto ($1x10^9$ UFC/paciente), houve pouquíssimos ($1x10^2$) microrganismos patógenos Gram negativos. Isso se justifica pelo fato que, conforme o biofilme progride dando início a DP ocorre uma transição do meio ambiente aeróbio para um meio privado de oxigênio, onde as bactérias gram-positivas são gradualmente substituídas por bactérias gram-negativas anaeróbicas ou anaeróbicas facultativas, com maior potencial patogénico (PEREIRA et al., 2016).

Observou-se que os indivíduos com periodontite severa apresentaram carga microbiana maior em relação aos outros, com vários tipos de colônias. Conforme CAMELO - CASTILLO (2015) a diversidade microbiana é maior em pacientes com DP do que em indivíduos saudáveis e aumenta conforme a doença progride.

Verificou-se que o número de gêneros bacterianos foi maior conforme a gravidade do quadro clínico da doença, sendo três gêneros identificados em pacientes com periodontite leve, seis gêneros em pacientes com periodontite moderada e dez gêneros identificados em pacientes com periodontite severa. O que condiz com o avaliado por MOMBELLI (2017) ou seja, conforme a periodontite progride, a diversidade da flora microbiana aumenta.

Staphylococcus sp. se mostrou como o gênero de maior frequência, tendo sido isolado de pacientes dos três quadros clínicos aqui avaliados. *Klebsiella azaenae*, *Citrobacter freundii*, *Streptococcus* sp. e *Pseudomonas* sp. também apresentaram elevada incidência na cavidade bucal dos pacientes. Tais resultados são semelhantes ao avaliado por COLOMBO et al. (2016).

4. CONCLUSÕES

A cavidade bucal de pacientes com periodontite apresenta uma grande diversidade microbiana. Essa diversidade é mais numerosa em pacientes com doença periodontal (DP) do que em indivíduos saudáveis. Ademais, dentre os microrganismos mais frequentes em pacientes com periodontite destaca-se *Staphylococcus* sp., *Citrobacter freundii*, *Klebsiella azaenae*, *Streptococcus* sp. e *Pseudomonas* sp..

5. APOIO FINANCIRO

Esta pesquisa teve apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, mediante Bolsa de pesquisa de Iniciação Cientifica - PIBIC.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAMELO-CASTILLO, A. J. et al. Subgingival microbiota in health compared to periodontitis and the influence of smoking. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 119, 2015.

COLOMBO, A. P. V. et al. Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance. **Microbial pathogenesis**, v. 94, p. 27-34, 2016.

GAURILCIKAITE, E.; RENTON, T.; GRANT, A. The paradox of painless periodontal disease. **Oral Diseases**, v. 23, n. 4, p. 451–463, 2016.

KINANE, D. F.; STATHOPOULOU, P. G.; PAPAPANOU, P. N. Periodontal diseases. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 17038, 22 jun. 2017.
MOMBELLI, A. Microbial colonization of the periodontal pocket and its significance for periodontal therapy. **Periodontology 2000**, v. 76, n. 1, p. 85–96, 1 fev. 2017.

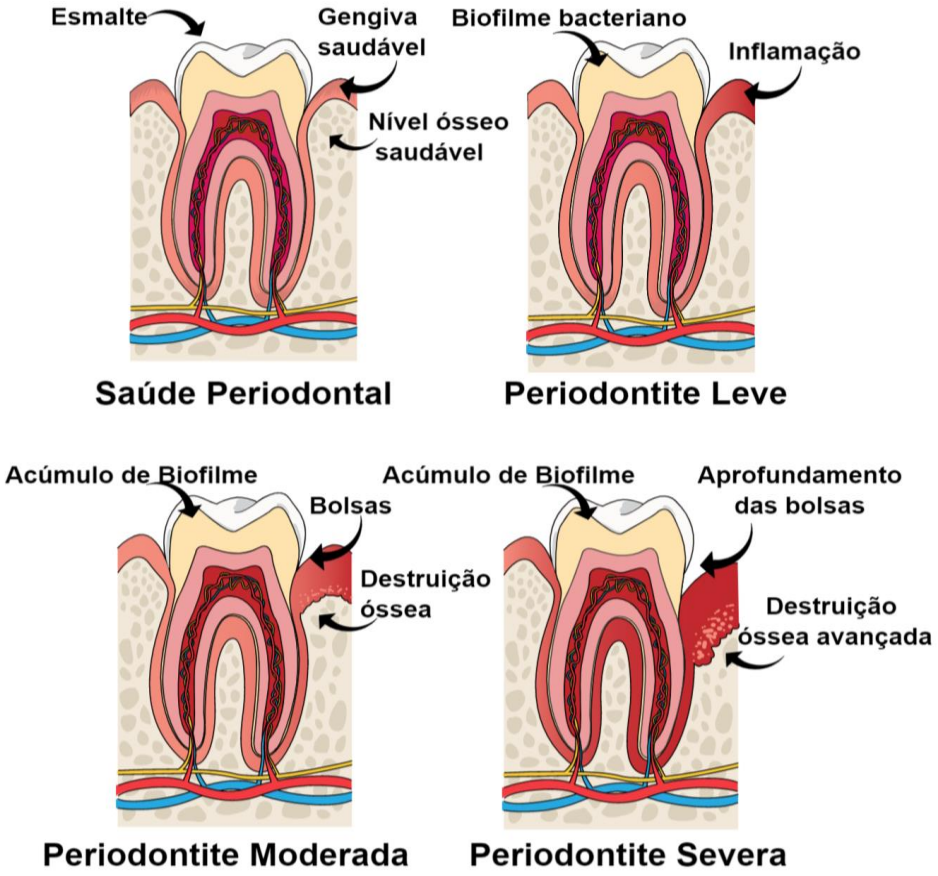
PEREIRA, G. J. C. et al. Doença periodontal materna e ocorrência de parto pré-termo e bebês de baixo peso – revisão de literatura. **Revista de Ciências e Saúde**, São Luís, v.18, n.1, p. 12-21, jan-jun, 2016.

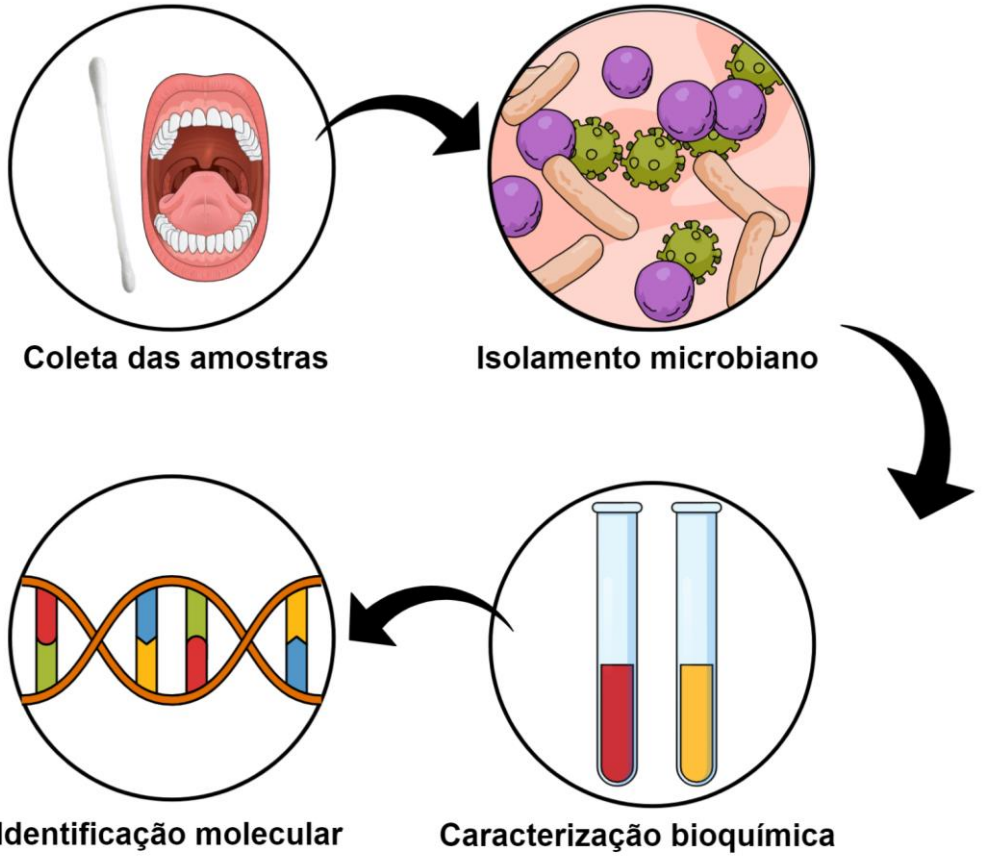
SAMISTRARO, Q. L. **Relação entre marcadores moleculares de estresse oxidativo, inflamação com o perfil microbiano da mucosa bucal em portadores de doença periodontal**. 2018. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação Mestrado Acadêmico em Ciência e Biotecnologia, Universidade do Oeste de Santa Catarina, campus Videira.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

ANÁLISE DO PERFIL MICROBIANO DE PACIENTES COM PERIODONTITE

RAFAELA ANSILIERO[1]; QUEILA DA LUZ SAMISTRARO[2]; CÉSAR MILTON BARATTO[2]; CLAUDRIANA LOCATELLI[2]; CRISTIAN ANTUNES DE ALMEIDA[2]; JANE MARY LAFAYETTE NEVES GELINSKI[3]





EFEITO ANTIBACTERIANO DE NANOPARTÍCULA BIOGÊNICA DE PRATA (Bio-AgNP) FRENTE A *Enterococcus faecalis* E *Klebsiella pneumoniae*

RODRIGO YUDI ISHIKAME[1]; SUZANE OLACHEA ALLEND[2]; DÉBORAH TROTA FARIAS DE ALBERNAZ[3];MIRIAN ELERT DA SILVA[4]; LUCIANO APARECIDO PANAGIO[5]; DAIANE DRAWANZ HARTWIG[6]

[1]Universidade Federal de Pelotas – rodrigo_y_i@hotmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas – suzane_olachea@yahoo.com.br
[3]Universidade Federal de Pelotas – debstrota@gmail.com
[4]Universidade Federal de Pelotas – mirian.elert@gmail.com
[5]Universidade Estadual de Londrina – lapanagio@uel.br
[6]Universidade Federal de Pelotas – daianehartwig@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana é uma das principais ameaças a saúde pública. Apesar de ser uma consequência natural à resposta de adaptação, o uso indiscriminado e a exposição frequente aos antibacterianos têm aumentado a pressão seletiva, e o desenvolvimento de novos mecanismos de resistência (LOUREIRO, et al., 2016). A disseminação de bactérias resistentes a antibióticos ocorre tanto no ambiente hospitalar quanto na comunidade. No entanto, o ambiente hospitalar, especialmente para pacientes imunodeprimidos internados em unidades de terapia intensiva (UTI), representa um local propício ao desenvolvimento desses patógenos e a aquisição de infecções relacionadas a assistência à saúde (IRAS) (SANTOS, 2004). Nesse sentido, *Enterococcus faecalis* e *Klebsiella pneumoniae* vem ganhando destaque. Estas espécies são bactérias comumente associadas à IRAS, causando infecções do trato urinário (ITU), infecções em feridas, bacteremias e pneumonias. Essas bactérias apresentam resistência contra uma vasta gama de antibacterianos (CHRISTOPHER et al., 2014; CDC, 2019).

Atualmente, os carbapenêmicos compreendem uma classe amplamente utilizada no tratamento de infecções envolvendo *K. pneumoniae.* Entretando, *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase (KPC), produzem uma enzima que degrada esta classe de antimicrobianos, conferindo proteção contra carbapenêmicos e também penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. As KPC constituem um importante mecanismo de resistência no contexto hospitalar mundial. (DIENSTMANN, et al., 2010) Também, a resistência à vancomicina por *Enterococcus* sp. (VRE) tem sido alvo de preocupações. O VRE é cada vez mais resistente a antibióticos adicionais, aumentando a apreensão em relação a eficácia destes medicamentos (SOUZA, 2013; CDC, 2019).

Visto que a problemática da resistência bacteriana tem se agravado, a falta de opções terapêuticas resultante justifica a busca por novas alternativas terapêuticas. O uso da nanotecnologia na área médica é uma realidade e, neste estudo, destacamos as nanopartículas de prata (AgNP). Estas tem ação antimicrobiana, inclusive contra bactérias resistentes à múltiplas drogas (RMD).

Quanto ao mecanismo de ação, sugere-se que as AgNP, ao entrarem em contato com a membrana celular da bactéria, podem causar danos ao processo de respiração celular e permeabilidade, além da ligação das AgNPs ao DNA, impedindo a divisão celular (RAMIN, 2016). Além disso, as AgNPs têm a vantagem de serem menores em tamanho, melhorando a capacidade de reagir com outras moléculas e facilitando a entrada na membrana plasmática da bactéria. Também, as nanopartículas de prata biogênica (Bio-AgNPs), produzidas por síntese biogênica ou verde, são obtidas a partir de extratos vegetais, fungos, algas ou leveduras (DURAN, et al., 2019). Essas possuem vantagens, por serem consideradas simples, de baixo custo, sustentáveis e, sem uso de agentes estabilizantes externos (FIGUEIREDO, et al., 2019). Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana das Bio-AgNP contra *Enterococcus faecalis e Klebsiella pneumoniae*.

2. METODOLOGIA

A Bio-AgNP utilizada foi formulada pelo método descrito por DURÁN et al. 2005, com adaptações, no Laboratório de Genética Molecular de ESALQ-USP (Piracicaba, São Paulo, Brasil). O método consisti na redução do nitrato de prata por *Fusarium oxysporum* cepa 551. Foram utilizadas as cepas padrão de *Enterococcus faecalis* ATCC® 51299™ e *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 700603™, pertencetes à bacterioteca do Laboratório de Biologia Molecular de Micro-organismos (LBMM) da Universidade Federal de Pelotas. As suspensões bacterianas foram preparadas em tubos contendo solução salina a 0,9%, a partir de cultivo fresco. A suspensão foi homogeneizada por agitação em vórtex e teve a densidade óptica medida à 630 nm (DO_{630}), correspondendo a 0,08-0,1, equivalente a escala 0,5 de McFarland (1,5 x 10^8 UFC/mL). O inóculo foi preparado com suspensão bacteriana na proporção de 1:20 em caldo Muller Hinton (MH-Kasvi®). O método utilizado para a determinação da atividade antimicrobiana seguiu conforme *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017). Foi utilizada uma placa para microdiluição com 96 poços e acrescentado nos mesmos, 50 µL de meio MH e 50 µL de Bio-AgNP na concentração inicial de 30 µg/mL. A microdiluição seguiu a escala 1:2, onde as concentrações variaram de 0,03-30 µg/mL da Bio-AgNP. Após a microdiluição, foram adicionados 50 µL do inóculo bacteriano na concentração mencionada acima. A microplaca foi incubada a 37°C durante 24 horas. Após o período de incubação, foram acrescentados 20 µL de resazurina 0,02%, que atua como indicador de viabilidade celular. A CMI foi definida como a concentração mínima capaz de inibir o crescimento bacteriano. O teste foi realizado em triplicata. A CMB foi determinada a partir dos resultados da CMI (CLSI, 2017), onde foram retiradas alíquotas dos poços em que houve inibição do crescimento bacteriano, semeadas em placa de MH e incubadas a 37°C por 24h. A ausência de crescimento bacteriano no meio MH indica que houve ação bactericida. O teste foi realizado em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da atividade antibacteriana encontram-se na Tabela 1. A Bio-AgNP apresentou CMI e CBM de 1,87 µg/mL para *E. faecalis* e, para *K. pneumoniae,* CMI de 1,87 µg/mL e CMB de 7,5 µg/mL.

Tabela 1. Concentração mínima inibitória (CMI) e Concentração bactericida mínima (CMB) da Bio-AgNP contra *E. faecalis* e *K. pneumoniae*

Cepa padrão ATCC	**Bio-AgNP µg/mL**	
	CMI	**CMB**
Enterococcus faecalis ATCC® 51299™	1,87	1,87
Klebsiella pneumoniae ATCC® 700603™	1,87	7,5

SCANDORIEIRO et al., 2016, avaliaram nanopartícula de prata biogênica e relataram que a Bio-AgNP apresenta um amplo espectro de ação, contra cepas padrão de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Estes autores observaram que o valor da CMI foi menor para *Escherichia coli* (0,106 mg/mL), quando comparada com *Staphylococcus aureus* (0,212 mg/mL). No nosso trabalho, a CMI para as cepas padrão avaliadas foi de 1,87 µg/mL, ou seja, não diferiu para Gram-positiva e Gram-negativa. Já a CMB foi de 1,87 µg/mL para *E. faecalis* e de 7,5 µg/mL para *K. pneumoniae,* representando um efeito bactericida. Também VIJAYAN et al., 2016, avaliando o efeito de nanopartículas de prata na inibição bacteriana, mostraram a capacidade destas de inibir o crescimento de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, como *K. pneumoniae* e *S. aureus*. É importante pontuar que as diferenças na estrutura da parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, são consideradas ponto chave na atividade biológica dos compostos. Além disso, outros fatores podem influenciar, como o tamanho (quanto menor mais eficientes), a morfologia e o revestimento da nanopartícula (SCANDORIEIRO, *et al*., 2016).

4. CONCLUSÕES

A Bio-AgNP apresentou efeito antibacteriano frente a *E. faecalis* e *K. pneumoniae* com CMI de 1,87 µg/mL e CMB de 1,87 µg/mL e 7,5 µg/mL, respectivamente, tendo, portanto, não só capacidade de inibir o crescimento, mas também de matar estas bactérias. Bio-AgNP pode ser considerada uma alternativa terapêutica contra a problemática da resistência antibacteriana, no tratamento de IRAS.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SANTOS, Neusa. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. Texto & Contexto Enfermagem [en linea]. 2004, 13(Esp), 64-70[fecha de

Consulta 26 de Julho de 2020]. ISSN: 0104-0707. Disponível em: https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=71409807

CHRISTOPHER, J. Kristich. Enterococcal Infection - Treatment and Antibiotic Resistance. **National Center of Biotechnology**, [*s. l.*], 2014.

LOUREIRO, Rui João. Use of antibiotics and bacterial resistances: Brief notes on its evolution. **ScienceDirect**, [*s. l.*], 2016.

CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019.

DIENSTMANN, R.; PICOLI, S. U.; MEYER, G.; SCHENKEL, T.; STEYER, J. Phenotypic research on *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) enzyme in Enterobacteriaceae from hospitals. **Jornal Brasileiro de Patol. Med. Lab.,** v.46, n.1, p. 23-27, 2010.

SOUZA, Marta Antunez. Emergência e disseminação de Enterococo Resistente à Vancomicina em Hospital Universitário no Centro Oeste do Brasil. **Digital Repository UFG**, [*s. l.*], 2013.

RAMIN, Beatriz Bianca. Síntese, caracterização e avaliação de nanopartículas de prata com o plurônico F-127. **Digital repository UTFPR**, [*s. l.*], 2016.

DURAN, N.; ROLIM, W. R.; DURAN, M.; FAVARO, W. J.; SEABRA, A. B. Nanotoxicologia de nanopartículas de prata: toxicidade em animais e humanos. **Química Nova**, v.42, n. 2, p. 206-213, 2019.

DURÁN, N.; MARCATO, P. D.; ALVES, O. L.; SOUZA, G. I. Esposito E. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several Fusarium oxysporum strains. **Journal Nanobiotechnology**,v. 3, p. 1-7, 2005.

FIGUEIREDO, E.P. New Approach for Simvastatin as An Antibacterial: Synergistic Effect with Bio-Synthesized Silver Nanoparticles Against Multidrug-Resistant Bacteria. **International Journal of Nanomedicine**, [*s. l.*], 2019.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement **and Laboratory Standards Institute**, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2017.

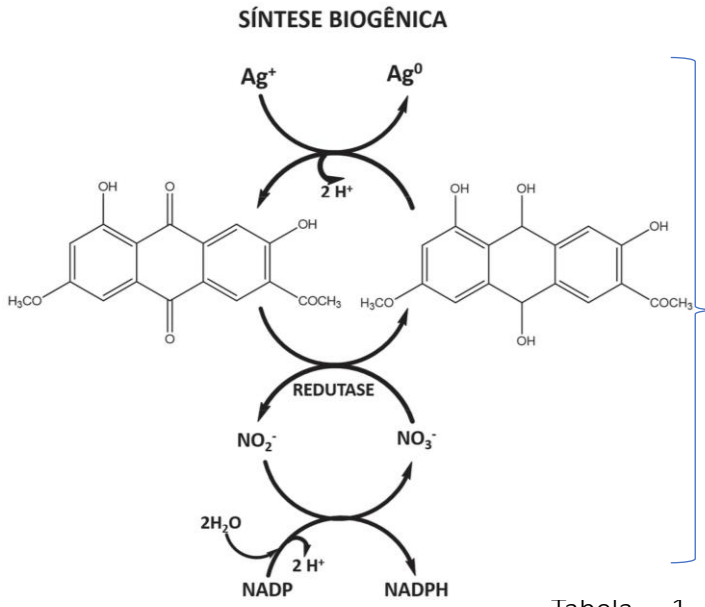
SCANDORIEIRO, Sara. Synergistic and Additive Effect of Oregano Essential Oil and Biological Silver Nanoparticles against Multidrug-Resistant Bacterial Strains. **Frontiers in Microbiology**, [*s. l.*], 2016.

VIJAYAN, Smitha. Biogenic Synthesis of Silver Nanoparticles Using Endophytic Fungi Fusarium oxysporum Isolated from Withania somnifera (L.), Its Antibacterial and Cytotoxic Activity. **American Scientific Publishers**, [*s. l.*], 2016.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

EFEITO ANTIBACTERIANO DA BIO-AGNP FRENTE A *Enterococcus faecalis* E *Klebsiella pneumoniae*

RODRIGO YUDI ISHIKAME[1]; SUZANE OLACHEA ALLEND[2]; DÉBORAH TROTA FARIAS DE ALBERNAZ [2];MIRIAN ELERT DA SILVA [2]; LUCIANO APARECIDO PANAGIO[2]; DAIANE DRAWANZ HARTWIG[3]



(DURÀN et al., 2019)

SUSPENSÃO BACTERIANA

K. Pneumoniae
E. faecalis

SOLUÇÃO SALINA A 0,9%

DENSIDADE ÓPTICA 0,08-0,1nm

ESCALA 0,5 MCFARLAND (1,5x 10^8 UFC/mL)

INÓCULO

PROPORÇÃO 1:20 CALDO MULLER HINTON

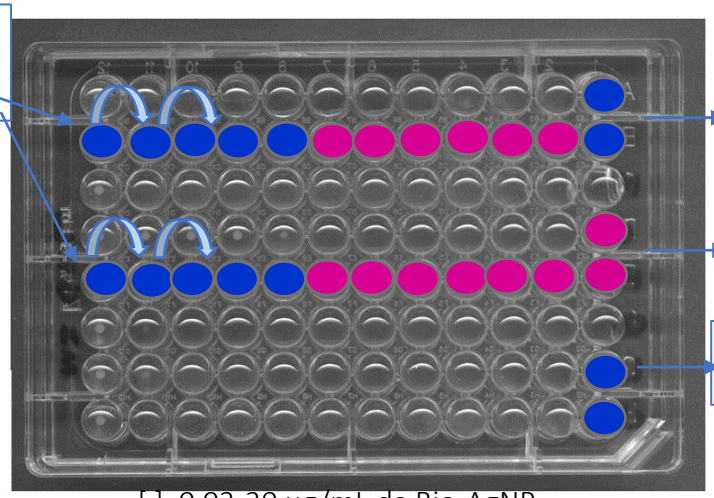
MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO (CLSI, 2017)

50 µL de meio MH e 50 µL de Bio-AgNP

50 µL do inóculo bacteriano

37°C/24h

20 µL de resazurina 0,02%



controle do meio

controle dos inóculos

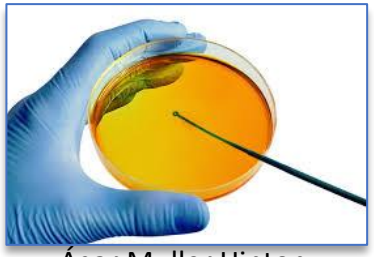
controle da Bio-AgNP

[ ] 0,03-30 µg/mL da Bio-AgNP

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CMI) e Concentração bactericida mínima (CMB) da Bio-AgNP

Cepa padrão ATCC	Bio-AgNP µg/mL	
	CMI	CMB
Enterococcus faecalis ATCC® 51299™	1,87	1,87
Klebsiella pneumoniae ATCC® 700603™	1,87	7,5

CMB



Ágar Muller Hinton

Incubado 37°C/24h

Concentração capaz de matar o micro-organismo

ESTABILIDADE TÉRMICA E PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DE XILANASES BRUTA E PURIFICADA DE *Aureobasidium pullulans*

TAIRINE DA ROSA RIBEIRO[1]; TAMIRES HÜBNER[2]; GABRIELLE VICTORIA GAUTÉRIO[2]; LARISSA GONÇALVES GARCIA DA SILVA[2]; SUSANA JULIANO KALIL[3]

[1]Universidade Federal do Rio Grande-FURG – tairinerr@gmail.com
[2] Universidade Federal do Rio Grande-FURG – gabriellevgautério@furg.br
[3]Universidade Federal do Rio Grande-FURG – dqmsjk@furg.br

1. INTRODUÇÃO

As endo-β-1,4-xilanases são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas β-1,4 da xilana, principal constituinte hemicelulósico da parede celular vegetal. Estas enzimas são produzidas por bactérias, fungos filamentosos e leveduras através de cultivo em estado sólido ou submerso, utilizando diferentes materiais lignocelulósicos como fonte de xilana (WALIA et al., 2017). Dentre os micro-organismos produtores de xilanases desta-ca se a levedura *Aureobasidium pullulans*, que é capaz de produzir altas quantidades da enzima mesmo em meio agroindustrial (GAUTÉRIO et al., 2020).

As xilanases são aplicadas, na sua forma bruta ou purificada, em diversos segmentos industriais incluindo papel e celulose, têxtil, rações animais, alimentos e biocombustíveis (KUMAR; DANGI; SHUKLA, 2018). Para aplicação das xilanases em processos sob temperatura controlada faz-se necessária a caracterização destas quanto à estabilidade térmica. A determinação dos parâmetros de termoestabilidade – constante de desnaturação térmica (kd), meia vida ($t_{1/2}$), valores *D* e *z*, energia livre de Gibb's (ΔG*), e variação de entalpia (ΔH*) e de entropia (ΔS*) – é essencial na compreensão da relação entre a estrutura proteica e a estabilidade da enzima (SANT'ANNA et al., 2010).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a estabilidade térmica de xilanase bruta e purificada de *A. pullulans*, e determinar os parâmetros termodinâmicos de desnaturação enzimática.

2. METODOLOGIA

O extrato bruto de xilanase foi obtido através do cultivo submerso de *A. pullulans* CCT 1261 utilizando farelo de arroz como substrato (GAUTÉRIO et al., 2020). O extrato purificado de xilanase (fator de purificação de 6,8 vezes e recuperação enzimática de 69,8%) foi obtido submetendo o extrato bruto à precipitação fracionada de 0-30% a 30-60% de $(NH_4)_2SO_4$, e posterior diálise (GAUTÉRIO, 2020).

A estabilidade térmica da xilanase bruta e purificada foi investigada através da incubação dos extratos enzimáticos na faixa de 40 a 60 °C com intervalo de 5 °C. Os extratos foram armazenados em frascos âmbar e mantidos em banho termostático na temperatura de estudo. Amostras foram retiradas periodicamente dos frascos, resfriadas em banho de gelo e utilizadas na determinação da atividade de endo-β-1,4-xilanase (BAILEY; BIELY;

POUTANEN, 1992; MILLER, 1959). Os ensaios foram conduzidos até que a enzima perdesse pelo menos 50% da sua atividade inicial.

O k_d (1/s) para cada temperatura foi determinado a partir do coeficiente angular do gráfico ln (A/A_0) *versus* o tempo de incubação, em que A é a atividade de xilanase em cada tempo de amostragem e A_0 é a atividade inicial de xilanase (t = 0). A $t_{1/2}$ (h), definida como o tempo que a atividade enzimática atinge 50% do seu valor inicial, foi calculada através do quociente entre o *ln (*2) e o k_d.

Os parâmetros termodinâmicos de desnaturação térmica da xilanase foram determinados através da equação de Arrhenius e do rearranjo da equação absoluta de Eyring, conforme as Equações 1 e 2, respectivamente:

$$\ln k_d = \ln A - \frac{\ln E_d}{RT} \quad (1)$$

$$k_d = \left(\frac{k_B T}{h}\right) e^{\left(\frac{-\Delta H^*}{RT}\right)} e^{\left(\frac{\Delta S^*}{R}\right)} \quad (2)$$

onde k_d é a constante de desnaturação térmica (1/s), A é a constante de Arrhenius, E_d é a energia de ativação para desnaturação enzimática (kJ/mol), R é a constante universal dos gases (8,315 × 10^{-3} kJ/mol.K), T é a temperatura absoluta (K), k_B é a constante de Boltzmann (1,38 × 10^{-23} J/K), h é a constante de Planck (6,63 × 10^{-34} J/s), ΔH^* é a variação de entalpia (kJ/mol) e ΔS^* é a variação de entropia. Os parâmetros ΔH^* e ΔS^* foram determinados a partir do rearranjo da Equação 2, enquanto o ΔG^* (kJ/mol) foi calculado pela Equação 3.

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^* \quad (3)$$

O valor *D* (min), foi calculado conforme a Equação 4, enquanto que o valor *z* (°C) foi calculado através do coeficiente angular do gráfico log *D versus* temperatura.

$$D = \frac{2{,}3026}{k_d} \quad (4)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme a Tabela 1, para ambos os extratos de xilanase, os valores de k_d foram inversamente proporcionais a $t_{1/2}$, indicando que a enzima é sensível a altas temperaturas. Maior estabilidade térmica foi observada à 40 °C, onde nesta temperatura os extratos bruto e purificado apresentaram $t_{1/2}$ de 20 d e 10 d, respectivamente. Além disso, o extrato bruto se mostrou mais estável termicamente comparado ao extrato purificado, fato este possivelmente relacionado à presença de compostos oriundos do meio de cultivo (ex. sais, açúcares) que contribuem para a estabilidade da enzima.

O valor *D* diminuiu consideravelmente com o aumento da temperatura e teve seu maior valor a 40 °C (Tabela 1). Além disso, o extrato bruto apresentou maiores valores *D* comparado ao extrato purificado em uma mesma temperatura, indicando que maior tempo de incubação é requerido para que a atividade inicial

da enzima bruta seja reduzida em 90%. Ambos os extratos apresentaram baixos valores de *z* (intervalo de temperatura necessário para modificar o valor *D* em um ciclo logarítmico), demonstrando a sensibilidade dos extratos ao incremento de temperatura. Contudo, os valores de *z* indicam a aplicação favorável de xilanase em temperaturas abaixo de 40 °C, tais como em processos elaboração de massa para pães, clarificação de sucos e produção de xilo-oligossacarídeos.

Tabela 1 – Valores de *z*, *D*, K_d e meia vida ($t_{1/2}$) obtidos a partir da desnaturação térmica de xilanase de *A. pullulans* CCT 1261 bruta e purificada.

Extrato	T (°C)	*D* (min)	*z* (°C)	k_d (1/s)	$t_{1/2}$ (h)
Bruto	40	98682,9	4,9	$3,9 \times 10^{-7}$	495,11
	45	5273,1		$7,3 \times 10^{-6}$	26,46
	50	255,7		$1,5 \times 10^{-4}$	1,28
	55	45,9		$8,4 \times 10^{-4}$	0,23
	60	8,3		$4,6 \times 10^{-3}$	0,04
Purificado	40	49341,4	4,7	$7,8 \times 10^{-7}$	247,55
	45	2933,2		$1,3 \times 10^{-5}$	14,75
	50	141,9		$2,7 \times 10^{-4}$	0,71
	55	10,7		$3,6 \times 10^{-3}$	0,05
	60	4,6		$8,4 \times 10^{-3}$	0,02

Tabela 2 – Parâmetros termodinâmicos de xilanase de *A. pullulans* CCT 1261 bruta e parcialmente purificada.

Extrato	T (°C)	E_d (KJ/mol)	ΔG^* (KJ/mol)	ΔH^* (KJ/mol)	ΔS^* (J/mol.K)
Bruto	40	408,6	114,2	406,0	931,6
	45		109,6		
	50		104,9		
	55		100,2		
	60		95,6		
Purificado	40	420,8	112,5	418,1	975,9
	45		107,6		
	50		102,8		
	55		97,9		
	60		93,0		

Segundo a Tabela 2, para ambos os extratos, os valores de ΔG^* diminuíram com o aumento da temperatura, indicando a ocorrência da desnaturação enzimática. O extrato bruto apresentou menor valor de ΔH^* comparado ao extrato purificado, sendo assim mais estável termicamente. Além disso, valores positivos de ΔH^* encontrados para os extratos indicam que o processo de inativação enzimática possui caráter endotérmico. Valores positivos de ΔS^* para os extratos sugerem o desdobramento da proteína em uma estrutura mais aleatória, sendo este efeito mais pronunciado no extrato purificado.

Os valores E_d médios foram obtidos em função da temperatura, quanto maiores os valores de E_d, maior é a energia necessária para a desnaturação enzimática, indicando maior estabilidade da biomolécula. No entanto, com base nos valores de k_d e ΔG^*, o extrato bruto apresenta maior estabilidade térmica em

relação ao purificado, contrariando o valor de E_d médio. Segundo KAZAN E ERARSLAN (1997), os valores de k_d ou o aumento nos valores de ΔG^* são critérios mais confiáveis para avaliar a estabilidade da biomolécula, quando comparado ao alto valor de E_d.

4. CONCLUSÕES

Os parâmetros de termoestabilidade (k_d, $t_{1/2}$, ΔH^*, ΔG^*, ΔS^*) dos extratos indicaram que o incremento da temperatura entre 40 °C a 60 °C leva à desnaturação enzimática, sendo este processo endotérmico e que ocasiona o desdobramento da proteína em uma estrutura mais desordenada. Na faixa de temperatura em estudo, o extrato bruto se mostrou mais estável termicamente em relação ao extrato purificado. Ambos os extratos apresentaram maior estabilidade à 40 °C, podendo ser aplicados em segmentos alimentícios que utilizam temperaturas iguais ou inferiores à esta.

Agradecimentos: Capes (código de financiamento 001), FAPERGS (Bolsa PROBIC) e CNPq (423285/2018-1 e 304857/2018-1).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 257–270, 1992.

GAUTÉRIO, G. V. **Produção e caracterização de enzimas xilanolíticas e xilo-oligossacarídeos a partir de substratos agroindustriais**. 2020. 290 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos - Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alientos, Universidade Federal do Rio Grande.

GAUTÉRIO, G. V.; DA SILVA, L. G. G.; HÜBNER, T.; DA ROSA RIBEIRO, T.; KALIL, S. J. Maximization of xylanase production by *Aureobasidium pullulans* using a by-product of rice grain milling as xylan source. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 23, n. January, 2020.

KAZAN, D.; ERARSLAN, A. Stabilization of *Escherichia coli* penicillin G acylase by polyethylene glycols against thermal inactivation. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 62, n. 1, p. 1–13, 1997.

KUMAR, V.; DANGI, A. K.; SHUKLA, P. Engineering thermostable microbial xylanases toward its industrial applications. **Molecular Biotechnology**, v. 60, n. 3, p. 226–235, 2018.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

SANT'ANNA, V.; UTPOTT, M.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Kinetic modeling of the thermal inactivation of bacteriocin-like inhibitory substance P34. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 5, p. 3147–3152, 2010.

WALIA, A.; GULERIA, S.; MEHTA, P.; CHAUHAN, A. Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

ESTABILIDADE TÉRMICA E PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DE XILANASES BRUTA E PURIFICADA DE *Aureobasidium pullulans*

TAIRINE DA ROSA RIBEIRO[1]; TAMIRES HUBNER[1]; GABRIELLE VICTORIA GAUTÉRIO[1]; LARISSA GONÇALVES GARCIA DA SILVA[1]; SUSANA JULIANO KALIL[1]
[1]*Universidade Federal do Rio Grande - FURG*



Obtenção de xilanase em cultivo submerso (extrato bruto)



Purificação de xilanase por precipitação salina



Extrato purificado de xilanase



Ensaios em banho termostático

Temperaturas de estudo:
*40°C
45°C
50°C
55°C
60°C



Determinação da atividade enzimática



Análises dos parâmetros termodinâmicos

→ O extrato bruto se mostrou mais estável termicamente em relação ao extrato purificado;
→ Ambos os extratos apresentaram maior estabilidade à 40 °C ($t_{1/2}$ de 20 d e 10 d).

OBTENÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS POTENCIALMENTE PREBIÓTICOS UTILIZANDO XILANASE BRUTA E PURIFICADA

TAMIRES HÜBNER[1]; TAIRINE DA ROSA RIBEIRO[2]; GABRIELLE VICTORIA GAUTÉRIO[2];LARISSA GONÇALVES GARCIA DA SILVA[2] ;SUSANA JULIANO KALIL[3]

[1]Universidade Federal do Rio Grande – tamires210897@gmail.com
[2]Universidade Federal do Rio Grande – gabriellevgauterio@furg.br
[3]Universidade Federal do Rio Grande – dqmsjk@furg.br

1. INTRODUÇÃO

As xilanases são enzimas que catalisam a clivagem das ligações glicosídicas β-1,4 da xilana (WALIA et al., 2017), principal polissacarídeo da fração hemicelulósica da biomassa vegetal, gerando xilo-oligossacarídeos (XOS) com diferentes graus de polimerização (GP) e eventualmente xilose (BIELY et al. 2016). Estas enzimas são aplicadas na indústria de papel e celulose, alimentícia, têxtil, rações, produtos químicos e de biocombustíveis. Dentre as aplicações promissoras das xilanases destaca-se a hidrólise enzimática de xilanas para obtenção de XOS (KUMAR et al., 2018).

Os XOS são oligossacarídeos não digeríveis contendo GP entre duas a dez unidades de xilose (FREITAS et al., 2019). A principal propriedade dos XOS está relacionada ao seu efeito prebiótico, estimulando o crescimento de bactérias benéficas ao trato gastrointestinal. Contudo, os XOS apresentam outros benefícios à saúde humana como prevenção à diabetes, melhoria no metabolismo lipídico e ação anti-inflamatória e antioxidante (BHATIA et al., 2019).

Na hidrólise enzimática de xilanas é interessante avaliar a necessidade de purificação prévia da enzima aplicada, visto que pode impactar na conversão em XOS e no perfil de carboidratos dos hidrolisados. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a aplicação de xilanase bruta e purificada na obtenção de XOS por hidrólise enzimática de xilana de madeira de faia.

2. METODOLOGIA

O extrato bruto de xilanase foi obtido a partir do cultivo submerso de *Aureobasidium pullulans* CCT 1261 em meio contendo farelo de arroz (GAUTÉRIO et al., 2020). O extrato purificado de xilanase (fator de purificação de 6,8 vezes e recuperação enzimática de 69,8%) foi obtido através da submissão do extrato bruto à precipitação fracionada de 0-30% e 30-60% de $(NH_4)_2SO_4$, e posterior diálise (GAUTÉRIO, 2020).

As hidrólises enzimáticas foram conduzidas em reatores encamisados contendo 75 mL do meio reacional composto por xilana de faia 3% (m/v) em tampão citrato de sódio 50 mmol/L pH 5,3, e extrato de xilanase (200 U/g de xilana) (AACHARY; PRAPULLA, 2009). As hidrólises foram mantidas sob agitação mecânica (180 rpm), 40 °C por 32 h. Alíquotas de 3 mL foram coletadas em intervalos de tempo predefinidos e aquecidas a 100 °C por 5 min para inativação enzimática. As amostras foram centrifugadas (10.000 × g a 4°C por

10 min) e os sobrenadantes analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

As concentrações de XOS e xilose nos hidrolisados foram determinadas a partir das curvas de calibração. A conversão de xilana em XOS (%) foi calculada pela relação entre a massa de XOS gerados pela massa inicial de xilana nos reatores, multiplicado por cem. Os ensaios foram submetidos ao teste *t* ou Análise de Variância (ANOVA) seguido da comparação *post-hoc* Tukey, ao nível de 5% de significância ($p<0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com as Tabelas 1 e 2, para ambas as reações utilizando os extratos enzimáticos bruto ou purificado, foi observada a hidrólise parcial dos XOS de maior GP em xilobiose e o aumento no teor de xilose ao longo do tempo. Além disso, a produção de XOS (mg/mL) estabilizou em 24 h e permaneceu constante estatisticamente ($p>0,05$) até às 32 h de reação. Devido à isto, o tempo de 24 h de reação foi escolhido para comparação da eficiência hidrolítica das enzimas bruta e purificada.

As conversões de xilana em XOS obtidas em 24 h de reação utilizando os extratos bruto (25,7%) e purificado (26,5%) não apresentaram diferença estatística entre seus valores pelo teste t ($p>0,05$). Em relação ao perfil de carboidratos em 24 h de reação, os hidrolisados obtidos apresentaram maior percentual de xilobiose (50,9% e 53,8%), seguido de xilotriose (30,9% e 32,8%) e XOs de maior GP (4,3% e 3,7%). Segundo SINGH et al. (2015), a alta quantidade de XOS com GP 2-3 é interessante para posterior uso em alimentos devido ao seu potencial efeito prebiótico.

Tabela 1 – Produção de XOS e xilose e percentual de conversão a partir de xilana de faia utilizando xilanase bruta de *A. pullulans* CCT 1261.

Tempo (h)	**Perfil de carboidratos (%)**					**XOs totais (mg/mL)**	**Conversão de xilana em XOs (%)**
	X_1	X_2	X_3	X_4-X_5	XOs totais		
2	4,9	35,1	38,6	21,4	95,1	$5,9 \pm 0,3^{e}$	$19,5 \pm 1,0^{e}$
4	6,4	40,5	38,1	15,1	93,6	$6,4 \pm 0,1^{d}$	$21,4 \pm 0,1^{de}$
6	7,7	43,4	37,3	11,5	92,3	$6,8 \pm 0,1^{cd}$	$22,7 \pm 0,3^{cd}$
8	8,8	45,3	36,6	9,5	91,2	$7,0 \pm 0,2^{bc}$	$23,3 \pm 0,4^{bcd}$
10	10,1	46,6	35,5	7,8	89,9	$7,1 \pm 0,2^{bc}$	$23,7 \pm 0,4^{abc}$
12	11,2	47,5	34,6	6,8	88,9	$7,2 \pm 0,2^{b}$	$23,9 \pm 0,3^{abc}$
24	13,9	50,9	30,9	4,3	86,1	$7,7 \pm 0,2^{a}$	$25,7 \pm 0,6^{a}$
28	16,2	50,1	29,7	4,0	83,8	$7,6 \pm 0,1^{a}$	$25,2 \pm 0,2^{ab}$
32	18,3	49,7	28,5	3,5	81,7	$7,4 \pm 0,2^{a}$	$24,8 \pm 0,8^{abc}$

Média ± erro padrão (n=2). Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença entre as médias pelo teste Tukey ($p > 0,05$). Legenda: X_1 – xilose; X_2 – xilobiose; X_3 – xilotriose; X_4 – xilotetraose; X_5 – xilopentose.

O uso do extrato purificado resultou em um hidrolisado com maior percentual de XOS totais (90,2%) comparado ao obtido pelo uso da enzima bruta (86,1%), em 24 h de reação. Hidrolisados com altos percentuais de XOS são preferíveis para aplicações em alimentos, pois possuem menor teor de xilose, a qual não possui efeito prebiótico (REDDY; KRISHNAN, 2016).

Tabela 2 – Produção de XOs e xilose percentual de conversão a partir de xilana de faia utilizando xilanase purificada de A. *pullulans* CCT 1261.

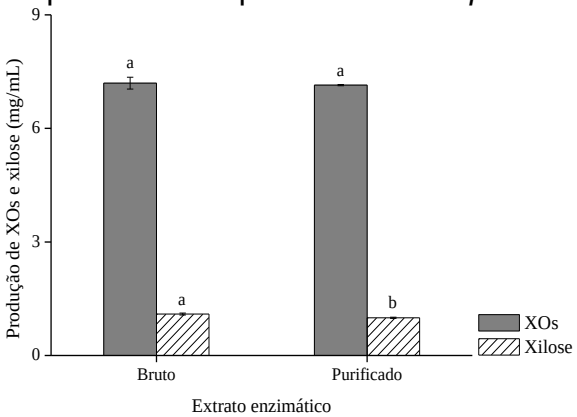
Tempo (h)	Perfil de carboidratos (%)					XOs totais (mg/mL)	Conversão de xilana em XOs (%)
	X_1	X_2	X_3	X_4-X_5	XOs totais		
2	4,1	35,7	39,1	21,2	95,9	6,0 ± 0,1^{e}	20,0 ± 0,2^{e}
4	5,1	41,3	38,9	14,8	94,9	6,7 ± 0,1^{d}	22,3 ± 0,3^{d}
6	5,9	44,5	38,2	11,4	94,1	7,0 ± 0,1^{cd}	23,3 ± 0,3^{cd}
8	6,6	46,7	37,5	9,2	93,4	7,2 ± 0,1^{bc}	24,0 ± 0,3^{bc}
10	6,9	48,5	36,9	7,7	93,0	7,4 ± 0,1^{b}	24,5 ± 0,3^{b}
12	7,7	49,7	36,2	6,5	92,3	7,5 ± 0,1^{b}	24,9 ± 0,3^{b}
24	9,8	53,8	32,8	3,7	90,2	7,9 ± 0,1^{a}	26,5 ± 0,3^{a}
28	10,3	54,5	31,7	3,5	89,7	8,1 ± 0,1^{a}	26,9 ± 0,3^{a}
32	10,8	55,0	31,0	3,1	89,2	8,1 ± 0,1^{a}	27,0 ± 0,2^{a}

Média ± erro padrão (n =2). Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença entre as médias pelo teste Tukey (p > 0,05). Legenda: X_1 – xilose; X_2 – xilobiose; X_3 – xilotriose; X_4 – xilotetraose; X_5 – xilopentose.

Conforme ilustra a Figura 1, a concentração de XOS nos hidrolisados oriundos do uso da enzima bruta e purificada foi estatisticamente igual (p>0,05), diferindo apenas no teor de xilose remanescente. Segundo GAUTÉRIO (2020), o maior teor de xilose no hidrolisado é justificado pela presença de β-xilosidases (as quais hidrolisam a xilobiose em xilose) no extrato enzimático bruto.

Uma vez que o teor de XOS totais não diferiu estaticamente (p>0,05) com o uso da enzima bruta e purificada, e que o acúmulo de xilose no meio pode ser controlado através dos parâmetros reacionais, o uso do extrato bruto também se mostrou promissor nas reações de hidrólise, permitindo assim a eliminação da etapa de purificação da enzima. Portanto, ambos os extratos podem ser aplicados na obtenção de XOS potencialmente prebióticos.

Figura 1 – XOS totais e xilose em 24 h de hidrólise de xilana de faia utilizando xilanase bruta e parcialmente purificada de *A. pullulans* CCT 1261.



Média ± erro padrão (n = 2). Letras iguais em colunas da mesma cor indicam que não há diferença entre as médias ao nível de 5% de significância pelo teste *t* (p>0,05).

4. CONCLUSÕES

O conteúdo de XOS totais e a conversão de xilana em XOS, em 24 h de reação, não apresentou diferença significativa pela aplicação dos extratos de

xilanase bruto ou purificado. Os hidrolisados exibiram alto percentual de xilobiose e xilotriose, característica interessante para posterior uso em alimentos devido ao potencial efeito prebiótico dos XOS de baixo GP.

Apesar da aplicação do extrato purificado resultar em um hidrolisado com menor conteúdo de xilose, isto pode ser contornado através dos parâmetros reacionais de produção de XOS. Assim, ambos os extratos enzimáticos se mostraram promissores na obtenção de XOS potencialmente prebióticos.

Agradecimentos: Capes (código de financiamento 001), FAPERGS (Bolsa PROBIC) e CNPq (423285/2018-1 e 304857/2018-1).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACHARY, A. A.; PRAPULLA, S. G. Value addition to corncob: Production and characterization of xylooligosaccharides from alkali pretreated lignin-saccharide complex using *Aspergillus oryzae* MTCC 5154. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 991–995, 2009.

BHATIA, L.; SHARMA, A.; BACHHETI, R. K.; CHANDEL, A. K. Lignocellulose derived functional oligosaccharides: production, properties, and health benefits. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 49, n. 8, p. 744–758, 2019.

BIELY, P.; SINGH, S.; PUCHART, V. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 7, p. 1260–1274, 2016.

FREITAS, C.; CARMONA, E.; BRIENZO, M. Xylooligosaccharides production process from lignocellulosic biomass and bioactive effects. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 18, p. 100184, 2019.

GAUTÉRIO, G. V. **Produção e caracterização de enzimas xilanolíticas e xilo-oligossacarídeos a partir de substratos agroindustriais**. 2020. 290 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos - Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alientos, Universidade Federal do Rio Grande.

GAUTÉRIO, G. V.; DA SILVA, L. G. G.; HÜBNER, T.; DA ROSA RIBEIRO, T.; KALIL, S. J. Maximization of xylanase production by *Aureobasidium pullulans* using a by-product of rice grain milling as xylan source. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 23, n. 101511, 2020.

KUMAR, V.; DANGI, A. K.; SHUKLA, P. Engineering thermostable microbial xylanases toward its industrial applications. **Molecular Biotechnology**, v. 60, n. 3, p. 226–235, 2018.

REDDY, S. S.; KRISHNAN, C. Production of high-pure xylooligosaccharides from sugarcane bagasse using crude β-xylosidase-free xylanase of *Bacillus subtilis* KCX006 and their bifidogenic function. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 237–245, 2016.

SINGH, R. D.; BANERJEE, J.; ARORA, A. Prebiotic potential of oligosaccharides : A focus on xylan derived oligosaccharides. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, p. 19–30, 2015.

WALIA, A.; GULERIA, S.; MEHTA, P.; CHAUHAN, A. Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

OBTENÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS POTENCIALMENTE PREBIÓTICOS UTILIZANDO XILANASE BRUTA E PURIFICADA

TAMIRES HÜBNER[1]; TAIRINE DA ROSA RIBEIRO[1]; GABRIELLE VICTORIA GAUTÉRIO[1]; LARISSA GONÇALVES GARCIA DA SILVA[1] ; SUSANA JULIANO KALIL[1]
[1]*Universidade Federal do Rio Grande - FURG*



Obtenção de xilanase em cultivo submerso (extrato bruto)



Purificação do extrato por precipitação salina



Extrato purificado de xilanase



Hidrólise enzimática (extrato de xilanase bruto ou purificado)



Centrifugação



Hidrolisado contendo XOS



Quantificação de XOS e xilose por CLAE



Análise estatística dos dados

↑ produção de XOS potencialmente prebióticos
↓ produção de xilose;
Conversão de xilana em XOS acima de 25%

DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO UTILIZANDO A PROTEÍNA rErpY-like NA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgM e IgG ANTI-*Leptospira* EM HUMANOS

THAYNÁ LANER CARDOSO[1]; STELLA BUCHHORN DE FREITAS[2]; HENRIQUE QUEIROZ SIMÃO[3]; ILANA TERUSZKIN[4]; DAIANE DRAWANZ HARTWIG[5]; MARTA GONÇALVES AMARAL[6]

[1]Universidade Federal de Pelotas – nanalaner@hotmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas – stellafreiitas@gmail.com
[3]Universidade Federal de Pelotas - henriquue15@gmail.com
[4]Fundação Oswaldo Cruz - ilana@ioc.fiocruz.br
[5]Universidade Federal de Pelotas - daianehartwig@gmail.com
[6]Universidade Federal de Pelotas - martagamaral@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença infecciosa negligenciada de distribuição global, associada principalmente à regiões tropicais e países subdesenvolvidos, acomete tanto animais silvestres e domésticos quanto humanos (COSTA et al., 2015). Os seres humanos são hospedeiros acidentais e a infecção é decorrente do contato direto ou indireto com animais infectados, principalmente através da urina de roedores, sendo estes os principais disseminadores desses patógenos (ZIN et al., 2019). A doença é causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* spp. (FAINE et al., 1999). Esse gênero compreende cerca de 30 espécies, com mais de 300 sorovares distintos, destes, 270 patogênicos, sendo *L. interrogans* a principal espécie responsável pelo desenvolvimento da doença em humanos e este fato está associado com seu maior tempo de sobrevivência quando exposta no ambiente (ESTEVES et al., 2018).

Atualmente, o padrão ouro recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para o diagnóstico de leptospirose é o Teste de Aglutinação Microscópica (MAT). Este ensaio consiste em confrontar diferentes sorovares de leptospiras patogênicas vivas, com o soro de pacientes suspeitos da infecção. Entretanto, apesar de usual, é um teste altamente laborioso, que apresenta riscos à saúde dos técnicos e pode também levar a resultados errôneos decorrente das diferentes interpretações (YAAKOB; K.F RODRIGUES; D.V. JOHN, 2015). O diagnóstico da leptospirose em humanos passa pelo exame clínico e pela coleta de amostras de soro, que são enviadas aos Laboratórios Centrais (LACEN). Nestes se faz um ensaio sorológico do tipo ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para o diagnóstico da enfermidade, no entanto, a confirmação do resultado sempre deve ser feito pela MAT. Estes ensaios do tipo ELISA, utilizados nos LACEN no Brasil, são importados e de alto custo, havendo a necessidade de um teste baseado em tecnologia nacional e que detecte tanto anticorpos IgM quanto IgG, representativos da fase aguda e convalescente da doença. Desta forma, torna-se evidente a necessidade de novas alternativas diagnósticas para a leptospirose (MUSSO; LA SCOLA, 2013).

A lipoproteína ErpY-like é descrita como uma proteína de *L. Interrogans* que é expressa *in vitro*, apresenta capacidade de ligação ao fibrinogênio plasmático, mostrou-se eficiente na proteção de hamster contra infecções letais

e foi eficaz para o diagnóstico de infecção em suínos, através da aplicação em teste do tipo ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) (JORGE et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018; PADILHA et al., 2019). O presente estudo buscou avaliar o potencial da proteína recombinante ErpY-like de *L. interrogans* no desenvolvimento de um teste do tipo ELISA indireto, na detecção de anticorpos IgG e IgM no soro de humanos naturalmente infectados.

2. METODOLOGIA

Produção da proteína recombinante ErpY-like (rErpY-like): a proteína ErpY-like foi produzida conforme descrito anteriormente (PADILHA et al., 2019).
Soros de humanos: os soros de humanos verdadeiramente positivos e negativos usados nesse trabalho foram cedidos pelo Laboratório Referência Nacional de Diagnóstico de Leptospirose da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, RJ, Brasil). Um total de 62 amostras foram analisadas, sendo 20 negativas e 42 positivas para leptospirose, as quais foram reativas para diferentes sorovares (título de anticorpos entre 100 e 6.400) e caracterizadas de acordo com a fase clínica da doença (20 de fase convalescente, 11 de fase aguda e 11 de fase indefinida). Essas amostras são oriundas de pacientes dos estados do Rio de Janeiro, Bahia, Espírito Santo, Pernambuco, Distrito Federal e Rio Grande do Sul, confirmados através da MAT.
ELISA indireto com a proteína rErpY-like: placas de poliestireno de fundo chato foram sensibilizadas com a proteína ErpY-like diluída em tampão carbonato–bicarbonato (50 µl, pH 9,6). Foram utilizadas 312,5 ng de proteína por cavidade da placa. Após incubação por 1h à 37°C, as cavidades foram bloqueadas com solução PBS-T/caseína [0.05% (v/v) *Tween* 20 e 0.5% (w/v) caseína no PBS] por 90 minutos e, posteriormente, os soros humanos foram diluídos em PBS 1X (pH 7,4) na proporção 1:50 e mantidos em contato com a proteína por 1h à 37°C. Para detecção do complexo antígeno-anticorpo formado, foram utilizados os anticorpos anti-IgG e anti-IgM humano conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich, USA), na diluição de 1:10.000. As placas de poliestireno foram mantidas à 37°C por 1h. Entre cada uma das etapas, as placas foram lavadas quatro vezes com solução PBS-T (PBS + 0,05% *Tween* 20). A visualização do teste foi feita através da adição de tampão fosfato-citrato (pH 5,3) acrescido de 0,2 mg/mL de *o-phenylenediamine dihydrochloride* (OPD) e 0,03% de H_2O_2. Uma solução 2M H_2SO_4 foi utilizada para parar a reação. A quantificação da reação foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 492_{nm}. Para análise dos resultados foi utilizado o software MedCalc® versão 8.0.0.0 (MedCalc Software, Ostend, Belgium). Os soros foram avaliados em duplicata nas placas e o experimento foi repetido três vezes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de ELISA-IgG indireto desenvolvido utilizando a proteina rErpY-like e soros de fase convalescente, apresentou um um *cut-off* (ponto de corte) >0,25, especificidade de 95,0% e sensibilidade de 100% (Figura 1A). Resultados que regulam com a literatura, pois foi realizada a detecção do anticorpo IgG, o qual

é comum na fase convalescente da doença (YAAKOB; K.F RODRIGUES; D.V. JOHN, 2015).

Os soros de fase aguda foram avaliados por ELISA-IgM indireto, utilizando a proteína rErpY-like, resultando em um *cut-off* >0,137, sensibilidade de 100% e especificidade de 80%, como pode ser observado na Figura 2B. ROSA et al. (2017) descrevem resultados similares na aplicação de ELISA-IgM indireto na fase aguda, obtendo sensibilidade de 90,0% e uma especificidade de 91,0%, isso ocorre pois os anticorpos IgM são detectados principalmente na fase inicial da doença (PICARDEAU et al., 2014).

Por fim, os soros de fase desconhecidas foram avaliados por ELISA-IgG e IgM indireto, apresentando um *cut-off* >0,5, sensibilidade de 100%, especificidade de 95% e *cut-off* >0,158, sensibilidade de 100% e especificidade de 96%, respectivamente (Figuras 1C e 1D). Estes resultados são semelhantes aos observados por PADILHA et al., 2019, que utilizando a mesma proteína para o diagnóstico de leptospirose suína, obteve sensibilidade e especificidade de 96,8% e 100%, respectivamente.

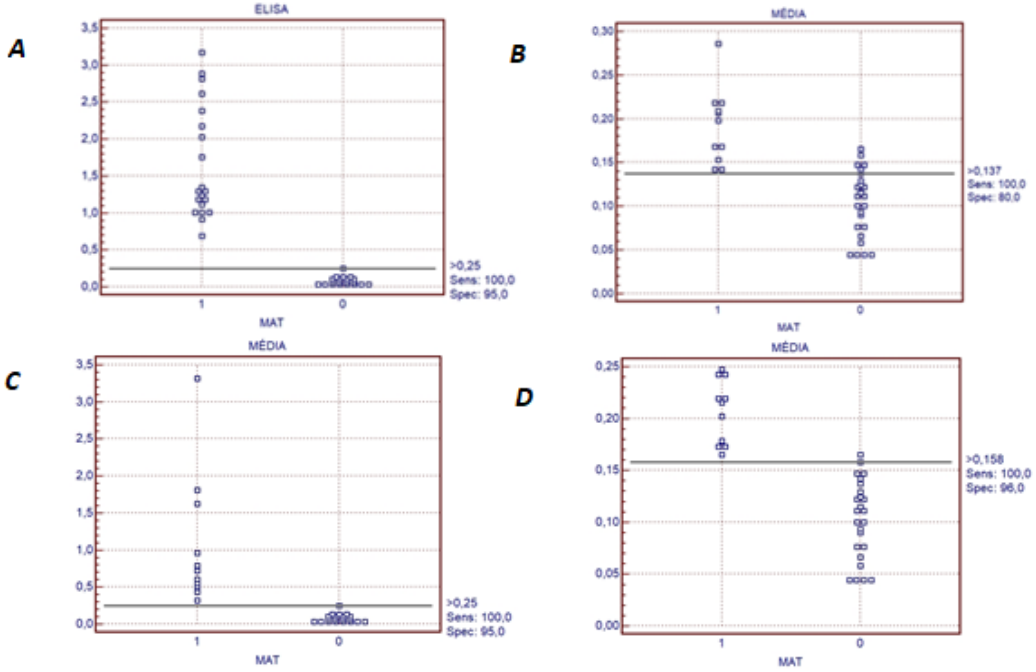


Figura 1: Utilização da proteína rErpY-like em ELISA indireto para detecção de anticorpos IgM e IgG anti-*Leptospira* em soros de humanos. *Cut-off*, sensibilidade e especificidade do teste, onde 1 são os soros positivos na MAT e 0 os negativos. **(A)** ELISA-IgG indireto com soros de fase convalescente. **(B)** ELISA-IgM indireto com soros de fase aguda. **(C)** ELISA-IgG indireto com soros de fase desconhecida. **(D)** ELISA-IgM indireto com soros de fase desconhecida.

4. CONCLUSÕES

O ELISA utilizando a proteína recombinante ErpY-like demonstrou ser um teste promissor, pois apresentou elevada sensibilidade e especificidade, independentemente da fase clínica da doença. Isso indica que a proteína foi reconhecida tanto por anticorpos IgG e IgM dos pacientes com o diagnóstico de leptospirose, confirmados pela MAT, os quais apresentam soros de diferentes

titulações e foram produzidos contra diferentes sorovares. Portanto, a proteína rErpY-like se destaca como potencial alvo para o diagnóstico sorológico da leptospirose em humanos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COSTA, F. et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. 0–1, 2015.

ESTEVES, L. M. et al. Diagnosis of Human Leptospirosis in a Clinical Setting: Real-Time PCR High Resolution Melting Analysis for Detection of Leptospira at the Onset of Disease. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.

FAINE, S. et al. **Leptospira and Leptospirosis (2nd edition)**. [s.l: s.n.].

JORGE, S. et al. Whole-genome sequencing of leptospira interrogans from southern Brazil: Genetic features of a highly virulent strain. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 2, p. 80–86, 2018.

MUSSO, D.; LA SCOLA, B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 46, n. 4, p. 245–252, 2013.

OLIVEIRA, T. L. et al. LemA and Erp Y-like recombinant proteins from Leptospira interrogans protect hamsters from challenge using AddaVax™ as adjuvant. **Vaccine**, 2018.

PADILHA, B. C. R. et al. The use of ErpY-like recombinant protein from Leptospira interrogans in the development of an immunodiagnostic test for swine leptospirosis. **Acta Tropica**, v. 193, n. February, p. 31–34, 2019.

PICARDEAU, M. et al. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: Current tools and emerging technologies. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 1, p. 1–8, 2014.

ROSA, M. I. et al. ELISA IgM para diagnóstico de leptospirose: Revisão sistemática e meta-análise. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 22, n. 12, p. 4001–4012, 2017.

YAAKOB, Y.; K.F RODRIGUES; D.V. JOHN. Leptospirosis: Recent incidents and available diagnostics– A review. **Medical Journal of Malaysia**, 2015.

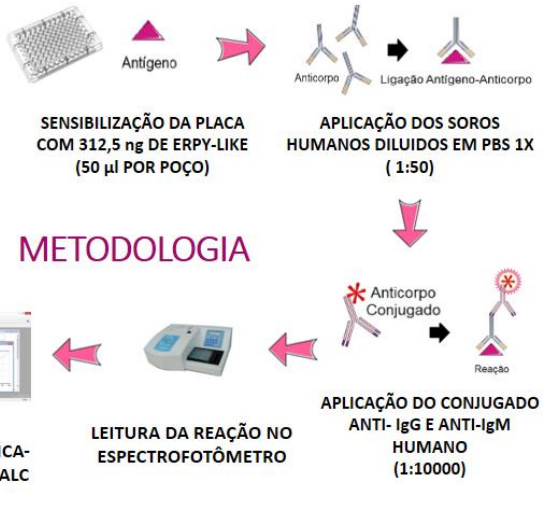
ZIN, N. M. et al. Evaluation of igm LAT and igm ELISA as compared to microscopic agglutination test (MAT) for early diagnosis of leptospira sp. **Tropical Biomedicine**, v. 36, n. 4, p. 1071–1080, 2019.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO UTILIZANDO A PROTEÍNA rErpY-like NA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgM e IgG ANTI-*Leptospira* EM HUMANOS

THAYNÁ LANER CARDOSO[1]; STELLA BUCHHORN DE FREITAS[2];
HENRIQUE QUEIROZ SIMÃO[3]; ILANA TERUSZKIN [4] ;
DAIANE DRAWANZ HARTWIG [5]; MARTA GONÇALVES AMARAL[6]

METODOLOGIA



SENSIBILIZAÇÃO DA PLACA COM 312,5 ng DE ERPY-LIKE (50 µl POR POÇO)

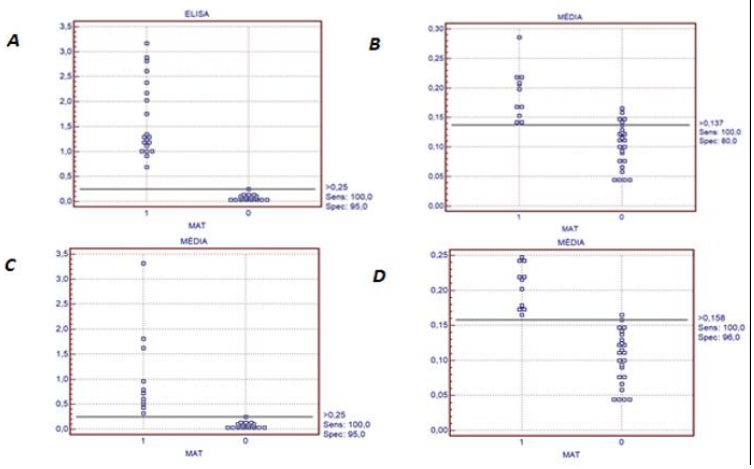
APLICAÇÃO DOS SOROS HUMANOS DILUIDOS EM PBS 1X (1:50)

APLICAÇÃO DO CONJUGADO ANTI- IgG E ANTI-IgM HUMANO (1:10000)

LEITURA DA REAÇÃO NO ESPECTROFOTÔMETRO

ANÁLISE ESTATISTICA- SOFTWARE MEDCALC

RESULTADOS



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE CURCUMINOIDES DURANTE CO-CULTIVO DE *Trichophyton rubrum* EM LINHAGEM DE MACRÓFAGO HUMANO THP-1

VANESSA INÁCIA BORGES DE SOUSA[1]; GABRIELA GONZALEZ SEGURA[2]; BRUNA ALINE MICHELOTTO CANTELLI[3]; ANA LUCIA FACHIN SALTORATTO[4]

[1]UNAERP – wanessainb@hotmail.com
[2]UNAERP – gabrielagonzalezsegura@hotmail.com
[3]UNAERP – brucantelli@hotmail.com
[4]UNAERP – afachin@unaerp.br

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) evidenciou que 20% da população possui dermatocomicoses, sendo que 10% da apresentam onicomicoses. Fungos causadores das dermatofitoses estão distribuídos em sete gêneros de acordo com a morfologia de seus macro e micro-conídios: *Trichophyton, Microsporum, Epidermophyton, Nannizzia, Lophophyton, Arthroderma e Paraphyton* (HOOG et al., 2016).

Dentre os dermatófitos destaca-se o *T. rubrum*, espécie mais prevalente entre as micoses humanas, responsável por cerca de 69,5% das infecções causadas por dermatófitos. De forma geral, as dermatofitoses provocadas por *T. rubrum* são de caráter crônico, não inflamatório, de progressão lenta e recorrente (PERES *et al*., 2010).

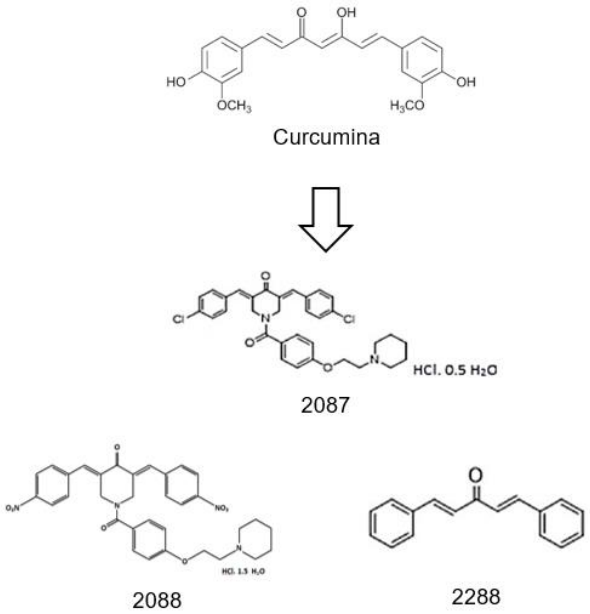
O dermatófito *T.rubrum* é capaz de modular a resposta imune impossibilitando o reconhecimento do patógeno pelo sistema de defesa celular, sendo este processo comprovado através de experimentos realizados em linhagens celulares pela tecnologia HCAT que tem como funcionalidade otimizar uma reação da forma desejada possibilitou a realização do experimento e evidenciou que houve a redução da resposta imunológica da célula contra o dermatófito favorecendo o processo infeccioso (HUANG *et al.,* 2015).

Apesar da alta prevalência de dermatofitoses em todo o mundo, ainda é escasso o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvendo a interação patógeno-hospedeiro, possivelmente por dificuldades técnicas para estabelecer modelos que mimetizam esta interação, além da ausência de ferramentas genéticas para o estudo desses organismos (ACHTERMAN, 2021). Além disso, segundo a literatura a linhagem de monócitos/macrofágos humanos THP-1 é a mais adequada para avaliar a resposta imunológica do hospedeiro com a interação com microrganismos (SABHARWAL, 2016).

A curcumina tem sido utilizada oralmente e topicamente para tratamentos de pele, que inclui parasitas, infecções, feridas infecciosas, inflamação e psoríase. Constatou-se que a droga é capaz de modular a ativação de células T e B, macrófagos, neutrófilos, células natural killer (NK), células dendríticas e também a secreção de citocinas inumes presentes no corpo (JAGETIA; AGGARWAL, 2007).

Portanto, o objetivo deste projeto foi realizar testes com curcuminoides, que são moléculas modificadas a partir da curcumina na University of Saskatchewan, apresentados na Figura 1. A parir destes compostos, avaliar a atividade antifúngica frente ao fungo *Trichophyton rubrum* e sua toxicidade nas células monócitos/macrófagos humanos (THP-1).

Figura 1: Estruturas químicas da curcumina e seus análogos



2. METODOLOGIA

Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizado a microdiluição dos compostos em placas de 96 poços e com concentração de 1 x10^5 conídios/mL. Após 7 dias, foi observado o crescrimento macroscópico do fungo e transferido para placas contendo meio Ágar Sabouraud Dextrose.

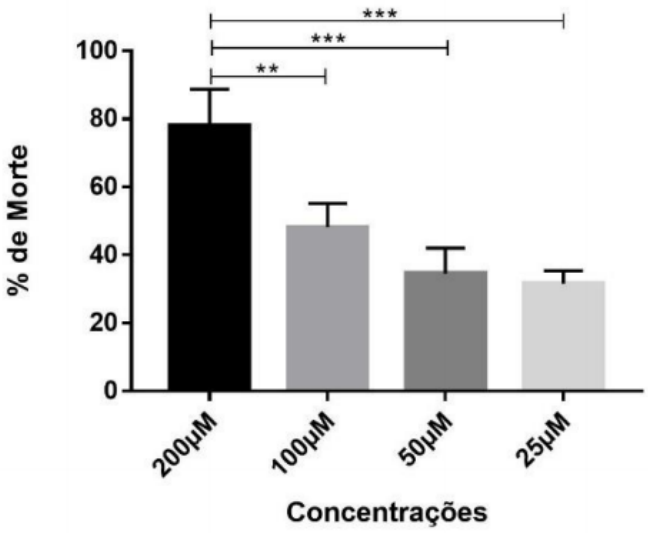
Para o ensaio de viabilidade celular da linhagem THP-1 foi utilizado o método MTT, o qual é um teste colorimétrico e utiliza como fundamento a conversão do sal {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]} em Formazan, o qual possui coloração azul escuro, nas mitocôndrias das células metabolicamente viáveis.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1: Determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e de Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos compostos contra *T. rubrum*.

Compostos	CIM (µM)	CFM (µM)
Fluconazol	50,9	-
2087	12,5	25,0
2088	5,9	11,8
2288	66,6	133,2

Figura 1: Porcentagem de viabilidade celular utilizando diferentes concentrações dos composto 2088 contra a linhagem celular THP-1. Onde *=p<0,01, **=p<0,05, ***=p<0,001 e ****=p<0,0001.



4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que os compostos modificados apresentaram resultados satisfatórios devido à atividade fungistática em concentrações menores que o controle utilizado. E além disso, não mostrou alta citotoxicidade na linhagem celular TPH-1 em concentração que apresentou funcionalidade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHTERMAN, R. R.; WHITE, T. C. A foot in the door for dermatophyte research. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 3, p. e1002564, 2012.

HOOG, G. S. *et al.* Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. **Mycopathologia** v.182, n. 1-2, p.5-31, 2016.

HUANG, X. *et al.* Trichophyton rubrum conidia modulate the expression and transport of Toll-like receptor 2 in HaCaT cell. **Microbial Pathogenesis**, v. 83-84, p.1-5, 2015.

JAGETIA, G. C.; AGGARWAL, B. B. "Spicing up" of the immune system by curcumin. **Journal of clinical immunology**, v. 27, n. 1, p. 19-35, 2007.

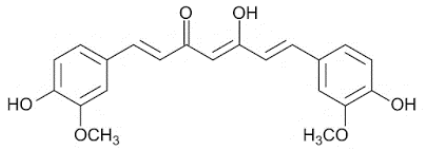
PERES, N. T. et al. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. **An Bras Dermatol,** v. 85, n. 5, p. 657-667, 2010.

SABHARWAL, H. et al. Interleukin-8, CXCL1, and MicroRNA miR-146a Responses to Probiotic Escherichia coli Nissle 1917 and Enteropathogenic E. coli in Human Intestinal Epithelial T84 and Monocytic THP-1 Cells after Apical or Basolateral Infection. **Infection and immunity**, v. 84, n. 9, p. 2482-2492, 2016.

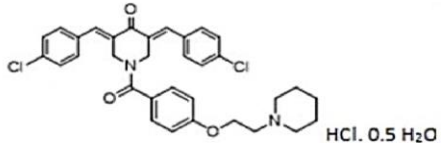
VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE CURCUMINOIDES DURANTE CO-CULTIVO DE *Trichophyton rubrum* EM LINHAGEM DE MACRÓFAGO HUMANO THP-1

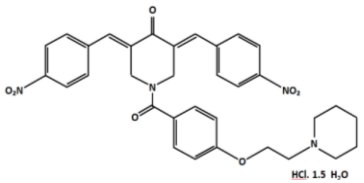
VANESSA INÁCIA BORGES DE SOUSA[1]; GABRIELA GONZALEZ SEGURA[2]; BRUNA ALINE MICHELOTTO CANTELLI[3]; ANA LUCIA FACHIN SALTORATTO[4]



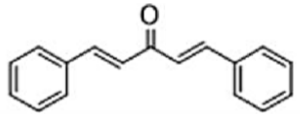
Curcumina



2087



2088

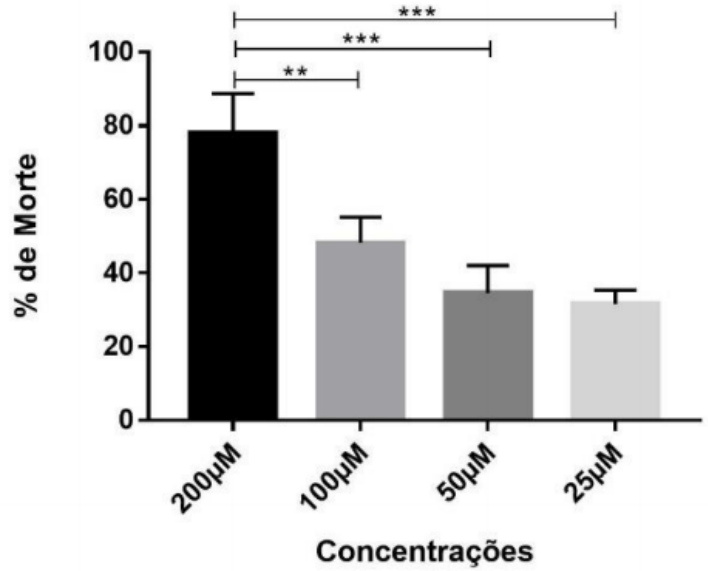


2288

Tabela 1: Determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e de Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos compostos contra *T. rubrum*.

Compostos	CIM (µM)	CFM (µM)
Fluconazol	50,9	-
2087	12,5	25,0
2088	5,9	11,8
2288	66,6	133,2

Figura 1: Porcentagem de viabilidade celular utilizando diferentes concentrações do composto 2088 contra a linhagem celular THP-1. Onde *=p<0,01, **=p<0,05, ***=p<0,001 e ****=p<0,0001.



COLIFORMES TERMOTOLERANTES EM ALHO PORÓ COMERCIALIZADO EM FEIRAS LIVRES NO MUNICÍPIO DE PELOTAS – RS

EDUARDA CAETANO PEIXOTO[1]; TATIANE KUKA VALENTE GANDRA[2]; ELIEZER ÁVILA GANDRA[3]

[1]Universidade Federal de Peloras– eduardacpeixoto@hotmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas – tkvgandra@yahoo.com.br
[3]Universidade Federal de Pelotas – gandraea@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

O alho-poró (*A*. *ampeloprasum* var. *porrum*) pertence a família Alliaceae, gênero que compreende várias espécies de hortaliças, como por exemplo, alho, cebola e cebolinha (Moreira, et al 2019). Estes vegetais são muito utilizados como tempero e, em alguns casos, como planta medicinal. São comercializados de diferentes formas, as mais comuns são *in* natura, secos ou desidratados (Albuquerque, 2015).

O alho-poró é fenotipicamente semelhante ao alho, se difere no formato, onde apresenta folhas alongadas e largas com coloração verde escuro (Andrade, 2018). Feiras livres são consideradas os lugares mais comuns para comercialização deste tipo de alimento, entretanto, muito se discute sobre as condições higiênico-sanitárias do local de fornecimento e comercialização.

As feiras livres são opções para grande parte da população, por oferecer alimentos saudáveis e ampla variedade de preços, são locais muito freqüentados (FERREIRA, 2016). Contudo, muitas destas feiras podem apresentar falhas de Boas Práticas de Fabricação, podendo assim, serem a origem de diferentes patologias associadas a alimentos (GOMES, et al. 2012).

Segundo o Ministério da Saúde, existem mais de 250 doenças transmitidas por alimentos (DTA). Vários são os microrganismos que podem contaminar os alimentos. As bactérias do grupo dos coliformes termotolerantes, por exemplo, quando presentes é um indicativo de condições higiênicos-sanitárias inadequadas. Dentre estas podemos citar a bactéria de *Escherichia coli,* que é considerada um agente patogênico causador de infecção alimentar. Estes microrganismos são encontrados na microbiota entérica de animais e seres humanos (Nogueira, et al 2011).

É de grande importância a avaliação de bactérias do grupo dos coliformes em alimentos, pois através do resultado é possível observar a qualidade e segurança do alimento analisado (Lundgren, et al 2009).

O presente trabalho teve como objetivo quantificarcoliformes termotolerantes em alho-poró comercializado em feiras livres no município de Pelotas/RS.

2. METODOLOGIA

Foram coletadas 40 amostras de 100 gramas de alho poró, vegetal considerado como “condimento” ou “tempero”, muito utilizado na gastronomia brasileira. As amostras foram adquiridas em feiras livres da cidade de Pelotas-

RS. A cada coleta eram adquiridas, na forma como eram comercializadas, duas amostras, totalizando 20 coletas no período de março de 2018 a março de 2020.

As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com as recomendações propostas pela American Public Health Association (APHA) (Downes&ito, 2001) com modificações.

As amostras foram pesadas e identificadas assepticamente e submetidas a diluições seriadas até a diluição 10^{-6}.

A análise presuntiva de coliformes foi realizada em Caldo Lauril Sulfato de Sódio (LST), com incubação a 35°C por 48 horas. A enumeração de coliformes termotolerantes foi realizada em Caldo *Escherichia coli* (EC), com incubação a 45,5°C por 24 horas. Os resultados foram expressos a partir da técnica do Número Mais Provável (NMP).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão dispostos os resultados obtidos para e coliformes termotolerantes em amostras de alho-poró.

Tabela 1- Quantificação de Coliformes Termotolerantes em 40 amostras de alho-poró vendidos em feiras livres da cidade de Pelotas-RS, Brasil.

Amostra (n)	Coliformes termotolerantes n (%)*
Alho poró (40)	8 (40)

n – número de amostras analisadas.

*Amostras com contagens acima de 5 x 10 NNP.g^{-1} que é o valor máximo permitido pela RDC 12/2001.

As amostras de alho poro foram obtidas em feiras livres no município de Pelotas, Rio Grande do Sul no período de março de 2018 a março de 2020. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, através do regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, é estabelecido um limite aceitável para a presença de coliformes termotolerantes de $5x10^2$NMP/g. Foram analisadas 40 amostras de alho poro, destas 8 estavam impróprias para o consumo, representando 20% das amostras, o que indica deficiência na qualidade higiênico-sanitária do produto.

A provável explicação para os resultados encontrados pode ser associada ao fato que feiras livres geralmente possuem condições precárias de higiene. Baseado nisto, as pesquisas microbiológicas em alimentos comercializados neste ambiente é crescente.

Uma pesquisa realizada por Viana e colaboradores (2016) constatou que os alimentos comercializados em feiras livres geralmente são mantidos sob baixas condições de higiene, incluindo as tendas e utensílios. Silva et al. (2015), analisando a qualidade microbiana de saladas de frutas manipuladas em feiras livres, verificaram péssimas condições higiênico-sanitárias, bem como a presença de *E. coli*, o que pode trazer riscos para saúde do consumidor, devido a este microrganismo ser causador de infecções alimentares. Um trabalho experimental, realizado por Macedo et al. (2016) avaliou a prevalência de coliformes e *Staphylococcus aureus* em mãos de manipuladores de alimentos de feira livre de Vitória, ES. Os resultados indicaram que os manipuladores são possíveis veiculadores de bactérias patogênicas. Comparando com outro trabalho realizado, Costa et al. (2009), estudou o perfil microbiológico de diferentes amostras de alimentos vendidos em feiras livres no município de Goiânia, GO. Foram analisadas196 amostras,

foi constatado que 22 amostras apresentaram contagem acima dos padrões permitidos pela legislação sanitária para coliformes termotolerantes (coliformes a 45°C), tais resultados estão em acordo aos encontrados em nosso estudo e denotam uma situação preocupante, considerando que estes microrganismos podem implicar em riscos à saúde dos consumidores.

Na maioria das feiras livres a contaminação pode ocorrer em diferentes pontos, o mais comum é através dos manipuladores. Uma provável explicação para este fato está na falta de conhecimento sobre o assunto, um questionário aplicado por Rodrigues (2015) interrogou os participantes sobre o conhecimento do meio de transmissão de doenças através de alimentos, como resultado, a maior parte dos entrevistados desconhece os meios de contaminação de alimentos. Indicando a falta de debate do assunto ou até mesmo instruções de maneira que visam evitar possíveis DTAs.

4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo fica evidente a necessidade de orientação, treinamento e conscientização dos feirantes e produtores rurais, principalmente daqueles que trabalham com alimentos *in* natura como o alho poró, para que possam implementar boas práticas de manipulação de alimentos, desta forma, reduzindo-se riscos de contaminação alimentar.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, M.; T. **DIVERSIDADE DE ISOLADOS DE Alternaria spp. ASSOCIADOS AO GÊNERO Allium NO BRASIL.** Universidade de Brasília – UnB, 2011.

ALBUQUERQUE, J.; R.; A. **DESEMPENHO AGROMORFOLÓGICO DE VARIEDADES CRIOULAS DE ALHO.** UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA/PRODUÇÃO VEGETAL. 2015

BRASIL. Ministério da Saúde. 2018. Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil. Brasília

BRASIL. RDC: Resolução nº 12 , de 02 de janeiro. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasil, 2001.

COSTA, R. M.; REZIO, M. A.; SANTANA, R. G. M.; CARVALHO, B. A.; AGOSTINHO, T. M. S.; MONEGO, E. T.; CAMPOS, R. H. **Perfil microbiológico de alimentos comercializados em feiras especiais de Goiânia, Goiás**. Revista Higiene Alimentar, Mirandópolis, v. 23, n. 170171, p. 60-61, 2009.

DOWNES, F. P.; ITO, H. **Compendium Of Methods for the microbiological examination of foods**.. 4. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 676 p. 2001.

FERREIRA, E., P. **ANÁLISE MICROBIOLOGICA DE COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES EM QUEIJOS COMERCIALIZADOS EM FEIRAS LIVRES NO MUNICIPIO DE PORTO VELHO – RO.** Trabalho de conclusão de curso de Bacharel em Biomedicina. CENTRO DE ENSINO SÃO LUCAS. Porto Velho. 2016.

GOMES, P., M., A.; BARBOSA, J., G.; COSTA, E., R.; **Avaliações das condições higiênicas sanitárias das carnes comercializadas na feira livre do município de Catolé do Rocha-PB**. Revista Verde. jan-mar;7(1):225-32. 2012.

LUNDGREN, P.; U. et al. **PERFIL DA QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA DA CARNE BOVINA COMERCIALIZADA EM FEIRAS LIVRES E MERCADOS PÚBLICOS DE JOÃO PESSOA/PB-BRASIL.**. Alim. Nutr., Araraquara v.20, n.1, p. 113-119, jan./mar. 2009

MACEDO, V., F.; ZANARDO, J., G.; LOPES, R., P., C.; MENDONÇA, H., F., M., S.; RAYMUNDO, N., L., S.; MORAES, R. **Prevalência de coliformes e *staphylococcus aureus* em mãos de manipuladores de alimentos de feira livre de Vitória, ES.** Revista Salus Jornal Health Sci. i. 2(2): 27-38. 2016.

MOREIRA, M. G. O. et al. ATIVIDADE TERAPÊUTICA DO Allium sativum COMO ANTIFÚNGICO: REVISÃO DE LITERATURA. **Mostra Científica da Farmácia**, [S.l.], v. 6, n. 1, jul. 2019. ISSN 2358-9124. Disponível em: <http://publicacoesacademicas.unicatolicaquixada.edu.br/index.php/mostracientificafarmacia/article/view/3525>. Acesso em: 31 Jul. 2020.

NOGUEIRA, M.; S. et al. **QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA E MICROBIOLÓGICA DA CARNE BOVINA COMERCIALIZADA NO MUNICÍPIO DE AREIA-PB.** Agropecuária Técnica – v. 32, n. 1, 2011 ISSN 0100-7467 – Areia, PB – CCA-UFPB

RODRIGUES, D. N. J. **Avaliação do conhecimento da população sobre as formas da transmissão e medidas preventivas da toxoplasmose em Mossoró – RN**. Trabalho de conclusão de curso – UFERSA 2015.

SILVA, N. **ANÁLISE DO RESULTADO FINANCEIRO DO CULTIVO DE ALHO: ESTUDO EM PROPRIEDADES RURAIS DE PEQUENO PORTE DE SANTA CATARINA.** Universidade Federal do Paraná. 2016.

SILVA, T., C.; CARVALHO, C., T.; LUZ, J., R., D.; ARAÚJU, L., B., A. **Salada de frutas no conceito street food: avaliação de qualidade microbiológica**. Rev Nutr Vigil Saude. nov;2(3):128-33. 2015.

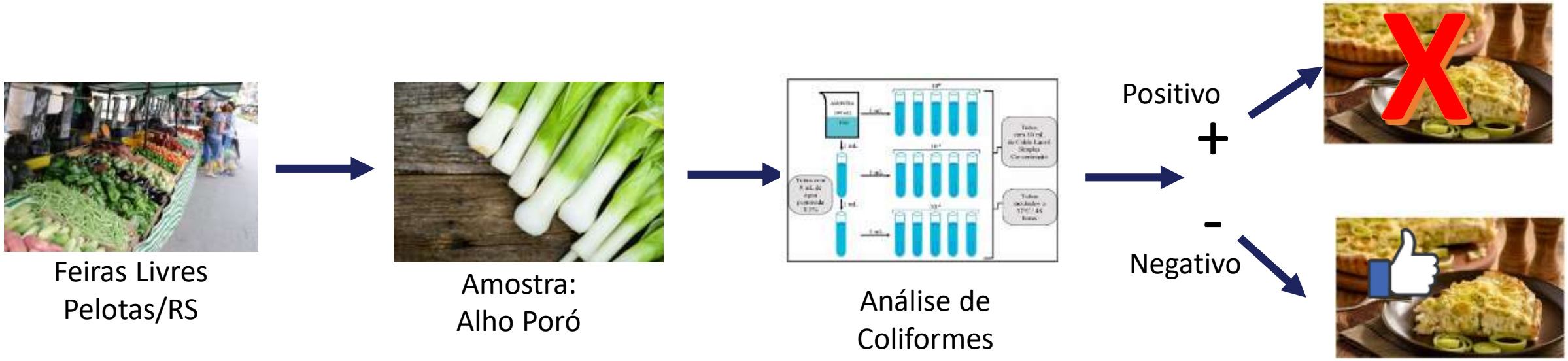
VIANA, I., VALIATI, T., B.; SOBRAL F., O., S.; ROMÃO N., F.; FONSECA C., X.; OLIVEIRA U., A. **Análise microbiológica do tambaqui (Colossoma macropomum) comercializado na feira municipal de Ariquemes, Estado de Rondônia.** Brasil. Rev Pan-Amaz Saude. jun;7(2):67-73. 2016.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

Laboratório de Ciência dos Alimentos e Biologia Molecular

COLIFORMES TERMOTOLERANTES EM ALHO PORÓ COMERCIALIZADO EM FEIRAS LIVRES NO MUNICÍPIO DE PELOTAS – RS

EDUARDA CAETANO PEIXOTO [1]; TATIANE KUKA VALENTE GANDRA[2]; ELIEZER ÁVILA GANDRA[3]



PROBIÓTICO LIVRE E MICROENCAPSULADO: MORFOLOGIA E RESISTÊNCIA AO ARMAZENAMENTO EM DIFERENTES TEMPERATURAS

FERNANDA WEBER BORDINI[1]; MICHELE DUTRA ROSOLEN[2]; PATRÍCIA DIAZ[3]; ÂNGELA MARIA FIORENTINI[4]; WLADIMIR PADILHA DA SILVA[5]; SIMONE PIENIZ[6]

[1]Universidade Federal de Pelotas – fernandawbordini@gmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas – michele.dutra@gmail.com
[3]Universidade Federal de Pelotas – bilica.diaz@gmail.com
[4]Universidade Federal de Pelotas – angefiore@gmail.com
[5]Universidade Federal de Pelotas – wladimir.padilha2011@gmail.com
[6]Universidade Federal de Pelotas – nutrisimone@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A pesquisa no setor de desenvolvimento de novos alimentos funcionais que contenham microrganismos como parte do processo, apresenta uma busca crescente por novos microrganismos isolados de diferentes matrizes alimentares, visto que estes podem apresentar potencial para melhora de palatabilidade, processabilidade e valor nutricional de uma ampla faixa de alimentos (ROSOLEN et al., 2019). Dentre as espécies isoladas, destacam-se as bactérias ácido-láticas (BAL), as quais têm sido incorporadas em alimentos fermentados e, algumas delas com potencial probiótico (LINARES et al., 2017).

Técnicas de encapsulamento aparecem neste contexto como necessárias para promover proteção a microrganismos probióticos, visto a alta susceptibilidade a desintegração proporcionada por condições adversas encontradas nos alimentos, armazenamento e até mesmo no processo digestório superior (YEUNG et al., 2016). Dentre as diversas técnicas destaca-se o *spray drying* ou secagem por atomização, muito utilizada na indústria de alimentos pelo seu baixo custo e alta reprodutibilidade. A técnica consiste na atomização de um liquido a altas temperaturas dentro de uma câmara de secagem, tendo como resultado final partículas secas (PEREIRA et al. 2018).

Com base no exposto acima, o presente estudo teve como objetivo produzir microcápsulas de *Pediococcus pentosaceus* P107 por *spray drying* utilizando como material encapsulante soro de queijo e pectina. Para isso, investigou-se a estabilidade ao armazenamento em diferentes temperaturas e a morfologia das microcápsulas, utilizando as células livres secas como controle.

2. METODOLOGIA

2.1 Estirpe e condições de cultivo

Pediococcus pentosaceus P107 (*P. pentosaceus* P107) foi mantido com glicerol a -20 ºC até o momento de uso, quando para otimizar do crescimento celular foi previamente cultivado em soro de queijo (Relat - Estação, RS, Brasil) reconstituído a 6%, o qual é pasteurizado a 65 ºc por 30 min. O inóculo foi adicionado numa concentração de 3% para reativação em agitador orbital (CERTOMAT BS-1, Germany) à 37 ºC, 180 rpm por 16 h, e após foi cultivado em biorreator de bancada (BIOSTAT B -New Brunswik, EUA) à 37 ºC e 100 rpm, *overnigth* a fim de atingir uma densidade celular alta. Sendo ambos cultivos sob anaerobiose. Ao final do processo de cultivo as células de *P. pentosaceus* P107

foram centrifugadas a 2370 *g* por 10 min a 4 °C e o pellet foi lavado em tampão fosfato-salino PBS (10 mM, pH 7,0).

2.2. Produção das microcápsulas

O material encapsulante utilizado foi soro de queijo associado a pectina e aerosil (SQP). Ambos materiais foram pasteurizados a 65 ºC por 30 min. Após o preparo das soluções encapsulantes o *pellet* de *P. pentosaceus* P107 foi acrescentado e mantido sob agitação magnética até o momento no qual foram submetidas ao processo de secagem utilizando *spray dryer* (LabMaq – MSDi 1.0, São Paulo, SP, Brasil). Os parâmetros utilizados foram 100 °C de temperatura de entrada, 68 °C de temperatura de saída, com fluxo de alimentação de 0,25 L h^{-1} e fluxo de ar de secagem 3,00 m 3 min^{-1}. O produto final seco foi coletado em frascos estéreis e armazenado em diferentes temperaturas. O processo de encapsulação e subsequentes análises foram realizadas em triplicata.

2.3 Morfologia da microcápsula

A morfologia das microcápsulas foi determinada em sete dias de armazenamento na temperatura de -20 °C. As amostras foram fixadas com uma fita de carbono dupla face, revestida com ouro por aspersão (Leica, modelo EM SCD 500, Wetzlar, Alemanha), visualizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) Jeol, modelo JSM - 6610LV (Jeol, Tóquio, Japão) em modo de alto vácuo para examinar a morfologia da superfície e estimar seu tamanho.

2.4 Viabilidade das células livres e microencapsuladas de Pediococcus pentosaceus P107 ao armazenamento em diferentes temperaturas

A viabilidade das células livres e das microcápsulas contendo *P. pentosaceus* P107 foram realizadas durante 30 dias de armazenamento, em três diferentes temperaturas: -20 ± 1°C (congelamento), 4 ± 1 °C (refrigeração) e 25 ± 1 °C (ambiente). Para o rompimento das microcápsulas de SQP, 0,01 g de pó foi disperso em uma solução ácida contendo pepsina durante 30 min, conforme MEIRA et al. (2012) com modificações. Para a determinação das células livres de *P. pentosaceus* P107, 0,01 g do pó foi suspenso em 1 mL de água peptonada 0,15% (m.v^{-1}) estéril e homogeneizada em vórtex. A contagem das células viáveis foi determinada por diluição seriada em água peptonada 0,15% (m.v^{-1}) e alíquotas dessas diluições foram inoculadas em ágar MRS, incubadas a 37 ^{0}C por 48 h em anaerobiose e a concentração das células viáveis foi expressa log UFC g^{-1}.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados referentes às células livres e microencapsuladas de *P. pentosaceus* P107 nas temperaturas de -20, 4 e 25 °C, durante 30 dias de armazenamento.

Tabela 1: Viabilidade cellular de *P. pentosaceus* P107 livre e microencapsulado submetido ao armazenamento a -20, 4 e 25°C

	P. pentosaceus P107 livre			*P. pentosaceus* P107 microcapsulado		
Dias	-20 °C	4°C	25°C	-20 °C	4 °C	25 °C
0	10.45 ± 0.28^{b}	10.45 ± 0.28^{b}	10.45 ± 0.28^{b}	13.63 ± 0.50^{a}	13.63 ± 0.50^{a}	13.63 ± 0.50^{a}
7	9.00 ± 0.00^{b}	8.69 ± 0.35^{b}	8.47 ± 0.00^{b}	13.54 ± 0.06^{a}	13.54 ± 0.06^{a}	13.39 ± 0.08^{a}
14	9.15 ± 0.15^{b}	8.81 ± 0.20^{b}	8.39 ± 0.08^{b}	13.00 ± 0.00^{a}	13.51 ± 0.20^{a}	13.25 ± 0.24^{a}
21	8.84 ± 0.06^{b}	8.39 ± 0.08^{b}	8.59 ± 0.11^{b}	12.69 ± 0.35^{a}	12.00 ± 0.00^{a}	13.15 ± 0.15^{a}
30	9.09 ± 0.05^{b}	8.21 ± 0.20^{b}	8.48 ± 0.43^{b}	12.58 ± 0.51^{a}	12.00 ± 0.00^{a}	13.83 ± 0.12^{a}

^{a,b} Letras diferentes correspondem a diferença estatística ($p<0,05$) dentro do mesmo intervalo de tempo (dias).

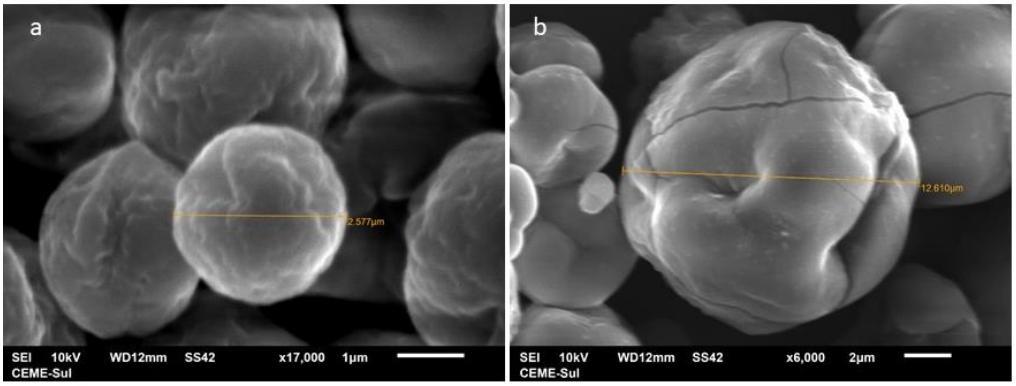
A célula livre apresentou uma redução logarítmica de 1,36, 2,24 e 1,97 UFC. g^{-1}, respectivamente para as temperaturas de -20, 4 e 25 °C ao final dos 30 dias analisados. Essa redução pode estar relacionada às lesões celulares causadas pela secagem no processo, o que resulta em morte celular (SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2008). Para a microcápsula a redução logarítmica para todas temperaturas variou de 0,42 a 1,63 UFC.g^{-1}, no entanto permaneceu com alta concentração celular ao final dos 30 dias analisados. Os resultados apresentados demonstram que probióticos microencapsulados apresentam viabilidade superior quando comparados com a célula livre (ROSOLEN et al., 2019).

No estudo de Yasmin et al. (2019) *B. longum* BL-05 foi microencapsulado com soro de queijo e pectina associados. Os autores referem que assim como o presente estudo, os materiais utilizados foram efetivos na proteção celular ao armazenamento por 28 dias a 4 °C, sendo superior as células livres.

A Figura 1 mostra as imagens de MEV das células livres e da microcápsula. A célula livre apresentou um tamanho médio de 2,98 ± 0,45 µm enquanto a SQP o valor foi de 6,99 ± 0,67 µm. A microcápsula SQP possui um formato levemente arredondado, e algumas deformações em sua superfície, que podem ser devidas à interação do material com a alta pressão exercida pela pulverização e ao encolhimento durante o processo e resfriamento (SINGH; KAUR, 2018).

Considerando o tamanho das microcápsulas obtidas, elas foram adequadas (até 80µm) para serem inseridas em alimentos, pois pequenas partículas garantem um produto homogêneo e de alta qualidade sem afetar as propriedades sensoriais (MARTÍN et al., 2015). No estudo de Rosolen et al. (2019), os autores observaram um valor médio de 12,73 µm para *Lactococcus lactis* subsp*. lactis* R7 microencapsulado como soro de leite e inulina.

Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura de *Pediococcus pentosaceus* P107 livre (a) e microencapsulado com soro e pectina (b).



4. CONCLUSÕES

A microencapsulação de *P. pentosaceus* P107 garantiu a viabilidade celular por 30 dias de armazenamento nas três diferentes temperaturas, e o tamanho e a morfologia das mesmas é considerada ideal, demonstrando potencial de aplicação na indústria de alimentos funcionais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LINARES, Daniel M. et al. Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria with Potential to Design Natural Biofunctional Health-Promoting Dairy Foods. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. MAY, p. 1–11, 2017.

MARTÍN, María José et al. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, [s. l.], v. 27, p. 15–25, 2015.

PEREIRA K.C.; FERREIRA D. C. M.; ALVARENGA G. F.; PEREIRA M. S. S.; BARCELOS M. C. S.; COSTA, J. M. G. Microencapsulação e liberação controlada por difusão de ingredientes alimentícios produzidos através da secagem por atomização: revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, [s. l.], v. 21, p. e2017083, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1981-6723.08317>

ROSOLEN, Michele Dutra et al. Symbiotic microencapsulation of Lactococcus lactis subsp. lactis R7 using whey and inulin by spray drying. **Lwt**, [s. l.], v. 115, n. January, p. 108411, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108411>

SANTIVARANGKNA, C.; KULOZIK, U.; FOERST, P. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 105, n. 1, p. 1–13, 2008.

SINGH, Jasdeep; KAUR, Kamaljit. Optimizing microencapsulation of a -tocopherol with pectin and sodium alginate. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 55, n. 9, p. 3625–3631, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3288-6>

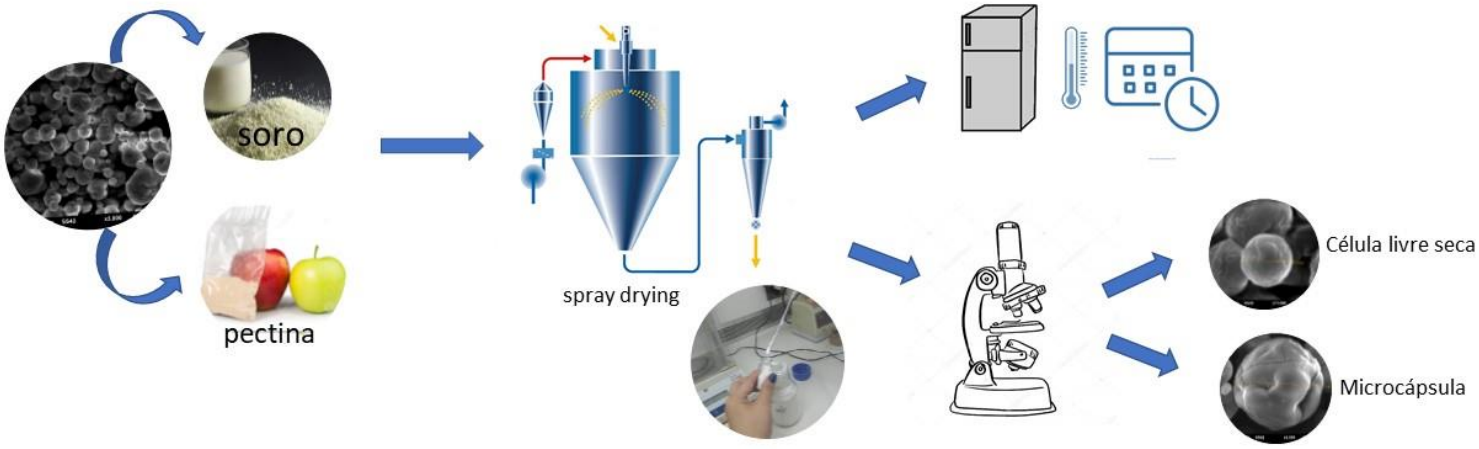
YASMIN, Iqra et al. Development of Whey Protein Concentrate-Pectin-Alginate Based Delivery System to Improve Survival of B. longum BL-05 in Simulated Gastrointestinal Conditions. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 413–426, 2019.

YEUNG, Timothy W. et al. Microencapsulation of probiotics in hydrogel particles: Enhancing: Lactococcus lactis subsp. cremoris LM0230 viability using calcium alginate beads. **Food and Function**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 1797–1804, 2016.

PROBIÓTICO LIVRE E MICROENCAPSULADO: MORFOLOGIA E RESISTÊNCIA AO ARMAZENAMENTO EM DIFERENTES TEMPERATURAS

FERNANDA WEBER BORDINI[1]; MICHELE DUTRA ROSOLEN[2]; PATRÍCIA DIAZ[3]; ÂNGELA MARIA FIORENTINI[4]; WLADIMIR PADILHA DA SILVA[5]
SIMONE PIENIZ[6]

P. Pentosaceus P107



CULTIVO DE MICROALGAS EM VINHAÇA PARA A BIORREMEDIAÇÃO E PRODUÇÃO DE BIOPRODUTOS

GABRIELE RODRIGUES CONCEIÇÃO[1]; IAN DA SILVA ANDRADE[2]; CARINE SOUZA DA SILVA[2], ISABELA VIANA LOPES DE MOURA[2], FÁBIO ALEXANDRE CHINALIA[2]

[1]Renorbio - Ponto Focal: Universidade Federal da Bahia – gabi.rodrigues29@hotmail.com
[2]Universidade Federal da Bahia – chinalia@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

O Brasil produziu 35,6 bilhões de litros de etanol na safra de 2019-2020 (CONAB, 2020). A vinhaça, o principal subproduto da indústria do álcool, é gerada numa proporção de 10-15L por litro de etanol, o que, nesse exemplo, equivaleu a cerca de 460 bilhões de litros de vinhaça.

A vinhaça possui uma composição complexa. Geralmente esse efluente tem coloração marrom escura, elevado teor orgânico (aproximadamente 45g/L, expressa em DQO - demanda química de oxigênio-), alta quantidade de sais minerais com destaque ao K^+, Ca^{2+} e Mg^{2+} e baixo pH (em torno de 3,0 a 4,5) (FUESS et al., 2014). Durante décadas, o destino mais comum da vinhaça é a fertirrigação do solo para o aproveitamento dos minerais (MORAES et al., 2015). No entanto, a concentrações de potássio e a sua alta carga orgânica podem impactar significativamente a fertilidade do solo após o seu uso contínuo. Tais impactos são ampliados pela lixiviação de sais, metais e sulfato, ocasionando a contaminação das águas superficiais e subterrâneas (FUESS et al., 2014; MORAES et al., 2015). Para minimizar os efeitos negativos da vinhaça na fertirrigação é necessário desenvolver opções para o uso desse resíduo.

O cultivo de microalgas em vinhaça é uma alternativa tanto para o tratamento como para a valoração desse efluente através da produção de bioprodutos de interesse industrial (PATEL et al., 2020). Distribuídos globalmente, *Raphidocelis subcapitata* e *Chlorella vulgaris* são as duas espécies de algas modelo comumente usadas em testes de toxicidade química e para produção de bioprodutos (OECD, 2011). Além disso, essas microalgas se destacam pela fácil adaptabilidade a diversos ambientes através de seu rápido crescimento, seja de forma autotrófica ou mixotrófica.

Portanto, o objetivo deste estudo foi produzir biomassa e bioprodutos de microalgas com importância comercial utilizando a vinhaça como meio de cultivo em diferentes concentrações aliado à um protocolo de valorização e tratamento da vinhaça (“upgrading”). Dessa forma essa proposta tem como meta uma visão integrativa de produção com o tratamento de resíduo resultando na intenção de dar sustentabilidade ao processo de produção de bioenergia.

2. METODOLOGIA

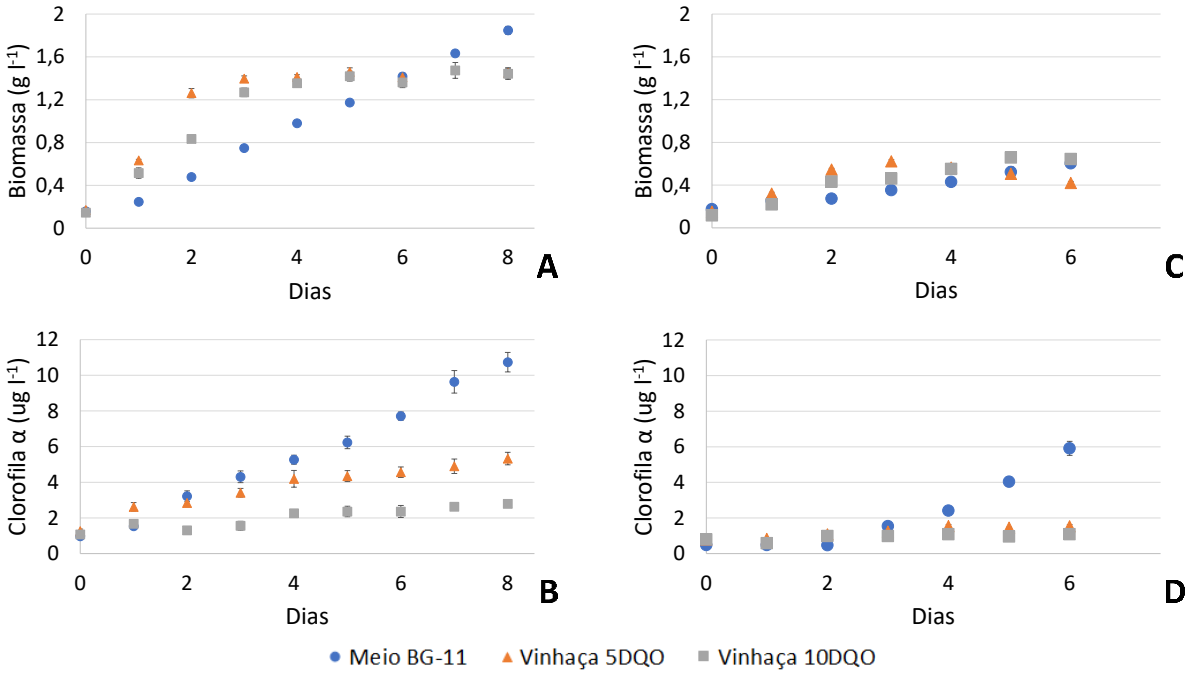
A vinhaça foi fornecida pela Agrovale (Agroindústrias do Vale do São Francisco S.A) e passou por uma etapa prévia de decantação, sendo coletada apenas o sobrenadante que teve o pH corrigido para 7,0. A cepa de *Raphidocelis*

subcapitata e *Chlorella vulgaris* foram cultivadas em meios compostos por vinhaça diluída a 10gO_2/L (Vin10DQO) e 5gO_2/L (Vin5DQO) suplementada com nitrato de sódio ($NaNO_3$) e fosfato de potássio (KH_2PO_4) para atingir os valores presentes na composição do meio sintético BG-11. Os ensaios em triplicata foram realizados em erlenmeyers de 1L contendo 540 mL de meio sob condições de fotoperíodo 12h:12h (claro/escuro), intensidade luminosa de 3500 lux, agitação 85 rpm, aeração com ar atmosférico e temperatura de 25°C±1°C. O crescimento de microalgas foi monitorado por densidade óptica (DO680nm), teor total de clorofila, pH e densidade bacteriana (ufc/mL). No início e ao fim do cultivo, amostras foram analisadas quanto à concentração de fosfato, nitrato e DQO. Ao fim do cultivo, a biomassa foi centrifugada e liofilizada para a extração de lipídeos pelo método clorofórmio:metanol (2:1) (FREEMAN et al., 1957).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As microalgas *C. vulgaris* e *R. subcapitata* cresceram em duas concentrações de vinhaça em 8 e 6 dias, respectivamente (Figura 1). Em relação a biomassa, as duas microalgas se mostraram adaptadas às duas concentrações de vinhaça, *C. vulgaris* atingiu valores de 78% em ambas vinhaças enquanto que *R. subcapitata* atingiu 68% na Vin5DQO e 100% na Vin10DQO em relação ao seus controles (Meio BG-11).

Figura 1: Crescimento das microalgas *Chlorella vulgaris* (A e B) e *Raphidocelis subcapitata* (C e D) em relação a biomassa e clorofila α.



Não se pode afirmar com exatidão que somente a microalga foi a responsável pela turbidez e biomassa atingida na curva de crescimento. Isso porque a vinhaça é meio não tratado, rico em nutrientes e propício para o crescimento de uma série de microrganismos autóctones, como bactérias, leveduras e fungos (HOARAU et al., 2018). Por isso análises de clorofila e

densidade bacteriana são fundamentais para guiar a interpretação dos resultados obtidos. Assim, é possivel visualizar na Tabela 1 que a densidade bacteriana nos cultivos com *C. vulgaris* diminui enquanto que nos cultivos com *R. subcapitata* aumentou. Indicando que possivelmente a biomassa registrada para *R. subcapitata* não foi somente da microalga e sim também de bactérias ou do seu crescimento mixotrófico.

Entretanto, quando analisamos a clorofila demonstra que Vin10DQO para ambas as algas tem os menores acúmulos, indicando que a coloração amarronzada da vinhaça inibe a penetração de luz, e dificultam a fotossíntese das algas (DOS SANTOS et al., 2016). Assim, tratamentos que clarifiquem a vinhaça, como a diluição, centrifugação e filtração podem melhorar a transmitância da luz, e essa está correlacionado diretamente com um melhor rendimento na produção de biomassa de algas.

Em relação ao acúmulo de lipídeos, todas as duas microalgas em ambas condições tiveram rendimento variando de 70-76% e 73-81% abaixo do controle (Meio BG-11) para *C. vulgaris* e *R. subcapitata*, respectivamente. Segundo Zhang et al. (2012), as algas em culturas puras tendem a acumular mais lipídios do que em culturas na presença de outros microrganismos. Portanto, novas estratégias para superar esse fato, como a depleção de nitrogênio ou aumento da salinidade podem ser método posteriores a serem testados para estimular o acúmulo de lipídeos em microalgas (JUNG et al., 2019).

O tratamento e remoção de nutrientes de um resíduo industrial é essencial para reduzir impactos ambientais como a eutrofização, promovendo assim um possível reuso da vinhaça pós cultivo. As taxas de remoção de *C. vulgaris* e *R. subcapitata* em vinhaça foram acimas de 82% para nitrato, 86% para fosfato e 59% para DQO. A destinação dessa vinhaça pós-cultivo pode ser a fertiirrigação, agora com valores inferiores de compostos orgânicos biodegradáveis e sais, evitando assim impactos ambientais negativos como salinização e a permanente acidificação do solo.

Tabela 1: Parâmetros avaliados durante o cultivo das microalgas.

	Chlorella vulgaris			*Raphidocelis subcapitata*		
	Controle	**Vin5DQO**	**Vin10DQO**	**Controle**	**Vin5DQO**	**Vin10DQO**
Produtividade de biomassa (g $l^{-1}d^{-1}$)	0,220 (±0,013)	0,352 (±0,030)	0,286 (±0,026)	0,070 (±0,075)	0,164 (±0,007)	0,092 (±0,006)
µ específico baseado na biomassa (d^{-1})	0,302 (R^2:0,91)	0,395 (R^2:0,85)	0,331 (R^2:0,92)	0,213 (R^2:0,96)	0,478 (R^2:0,98)	0,327 (R^2:0,87)
Taxa de acúmulo de clorofila (µg $l^{-1}d^{-1}$)	1,281 (±0,088)	0,481 (±0,073)	0,210 (±0,031)	1,10 (±0,16)	0,191 (±0,017)	0,149 (±0,032)
µ específico baseado na clorofila (d^{-1})	0,200 (R^2:0,99)	0,222 (R^2:0,85)	0,113 (R^2:0,85)	0,479 (R^2:0,92)	0,124 (R^2:0,89)	0,081 (R^2:0,85)
µ específico baseado no LN de bactérias (d^{-1})	-	-0,619	-0,705	-	1,66	1,70
Conteúdo lipídico (%)	27,45 (±0,88)	19,47 (±0,69)	20,94 (±0,82)	26,03 (±0,54)	21,12 (±0,25)	19,21 (±0,37)
Produtividade lipídica (mg $l^{-1}d^{-1}$)	60,39	68,53	59,88	18,22	34,63	17,67
Taxas de remoção de NO_3 (%)	76,02	82,55	>95	80,64	82,40	>95
Taxas de remoção de PO_4 (%)	74,66	>95	86,39	71,47	92,32	>95
Taxas de remoção de DQO (%)	12,9	80,31	59,14	29,87	87,55	72,65

4. CONCLUSÕES

É sabido que altas quantidades de vinhaça gerada corresponde ao aumento da produção global de etanol. Portanto, uma adequada destinação desse resíduo tem atraído muita atenção. A vinhaça foi testada como um meio de cultivo para as microalgas *Chlorella vulgaris* e *Raphidocelis subcapitata*, que acumularam significativa quantidade de biomassa e clorofila durante o cultivo. Concomitantemente, houve a redução da concentração de nutrientes e carga organica após o cultivo. Portanto, é também um processo promissor para o tratamento desse efluente. A diluição da vinhaça para o cultivo de microalga parece ser necessária para reduzir sua coloração e turbidez e facilitar o processo autotrófico. O cultivo de microalgas oleaginosas pode aumentar significativamente a viabilidade da cadeia produtiva do biodiesel. O fator limitante para tanto está nos custos com a preparação de meio sintético. O aproveitamento da vinhaça como meio de cultivo pode baratear significativamente a produção de biodiesel produzido com o lipídeo algal.

Agradecimentos: UFBA, RENORBIO, CAPES, AGROVALE.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira: Boletim de cana-de-açúcar. Acessado em 29 de julho de 2020. Online. Disponível em: https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana.

DOS SANTOS, R.R.; ARAÚJO, O.; DE Q.F.; MEDEIROS J.L.; CHALOUB, R.M. Cultivation of Spirulina maxima in medium supplemented with sugarcane vinasse. **Bioresource Technology,** v. 204, pg. 38–48, 2016.

FREEMAN, N.F.T. LIDGREN, Y.C.NG.; NICHOLS, A. V. Serum lipid analisis by chromatography and infrared spectrophotometry. **J. Biol. Chem**. 277:449-464, 1957.

FUESS, L.T.; GARCIA, M.L.; ZAIAT, M. Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation. **Journal of Environmental Management**. v. 145, 210-229, 2014.

HOARAU, J.; CARO, Y.; GRONDIN, I.; PETIT, T. Sugarcane vinasse processing: Toward a status shift from waste to valuable resource. A review, **Bioresource technology**, v.24, 11-25, 2018.

JUNG, J-H.; SIRISUK, P.; RA, C.H.; KIM, J-M.; JEONG, G-T.; KIM, S-K. Effects of green LED light and three stresses on biomass and lipid accumulation with two-phase culture of microalgae. **Process Biochemistry**, v.77, 93-99, 2019.

MORAES, B. S.; ZAIAT, M.; BONOMI, A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane etanol production in Brazil: Challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, n.44, 888-903, 2015.

OECD, 2011. OECD Guidelines for the testing of chemicals 2011. Acessado em: 29 de julho de 2020. Online. Disponível em https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-201-alga-growth-inhibition-test_9789264069923-en#page1

PATEL, A.K.; CHOI, Y.Y.; SIM, S.J. Emerging prospects of mixotrophic microalgae: way forward to sustainable bioprocess for environmental remediation and cost-effective biofuels. **Bioresource Technology**, v.300, 2020.

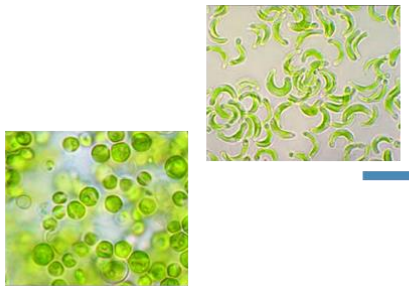
STATISTA. Fuel ethanol production worldwide in 2019, by country (in million gallons). Acessado em: 29 de julho de 2020. Online. Disponível em: https://www.statista.com/statistics/281606/ethanol-production-in-selected-countries/

ZHANG, Y.; SU, H.; ZHONG, Y.;ZHANG, C.; SHEN, Z.; SANG, W.; YAN, G.; ZHOU, X. The effect of bacterial contamination on the heterotrophic cultivation of Chlorella pyrenoidosa in wastewater from the production of soybean products. **Water research**. v. 46, p. 5509-5516, 2012.

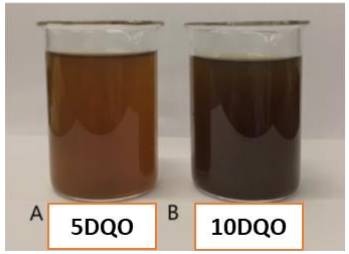
VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

CULTIVO DE MICROALGAS EM VINHAÇA PARA A BIORREMEDIAÇÃO E PRODUÇÃO DE BIOPRODUTOS

GABRIELE RODRIGUES CONCEIÇÃO[1]; IAN DA SILVA ANDRADE[2]; CARINE SOUZA DA SILVA[2], ISABELA VIANA LOPES DE MOURA[2], FÁBIO ALEXANDRE CHINALIA[2]



Microalgas

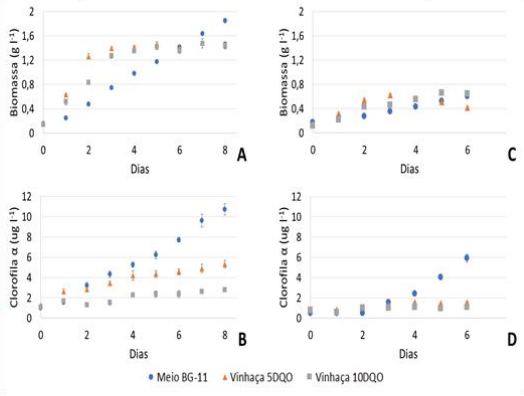


Vinhaça

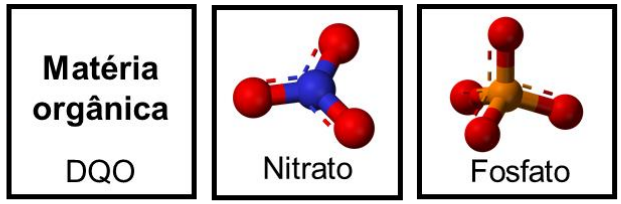


Cultivo para Obtenção dos Bioprodutos





Análises Cinética de Biomassa e Clorofila



Quantificação da Remoção dos Nutrientes na Vinhaça



Biomassa Liofilizada



Quantificação de Lipídeos

ENCAPSULAÇÃO DE PROBIÓTICOS: UMA BREVE REVISÃO SOBRE AS TÉCNICAS UTILIZADAS E SUAS CARACTERÍSTICAS.

GUILHERME DA SILVA MENEGAZZI[1]; MICHELE RAMOS DUTRA ROSOLEN[2]; PATRICIA DIAZ[3]

[1]Universidade Federal de Pelotas – guilherme_menegazzi@hotmail.com
[2] Universidade Federal de Pelotas – michele.dutra@gmail.com
[3] Universidade Federal de Pelotas – bilicadiaz@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Encapsulação é uma tecnologia que permite que pequenas partículas sólidas ou líquidas do material de interesse sejam envolvidas por um agente encapsulante de modo a criar microcápsulas (GARCIA, 2016). A partícula formada pode variar de 0,2 a 5000 micrometros (µm) sendo denominada de núcleo e o material de revestimento de material de parede (NOGUEIRA, 2017).

Cabe destacar que a encapsulação é um dos métodos mais eficientes para a proteção de probióticos a fatores adversos como luz, alta concentração de oxigênio, aquecimento, umidade e possibilitando a liberação controlada sobre condições específicas. (POLETTO et al., 2019).

Há inúmeras técnicas disponíveis como *spray dryer*, *spray cooling*, coacervação, extrusão, lipossomas, recobrimento em leito fluidizado, complexação por inclusão e por liofilização.

A escolha da técnica deve considerar propriedades físicas e químicas do material de parede e do núcleo, não reatividade com o material de núcleo, estabilidade, tamanho da cápsula e forma final (JANISZEWSKA-TURAK, 2017).

Segundo Carvalho (2017), a seleção do material de parede depende da substância a ser encapsulada e das características desejadas do produto final. O material deve ser selecionado de acordo com o método de encapsulação escolhido e com base nas propriedades físico-químicas, tais como solubilidade, peso molecular, cristalinidade, difusividade, temperaturas de transição de fase, formação do filme e propriedades emulsificantes (GARCIA, 2016).

Como a maioria dos compostos não possui todas estas características, é comum a combinação de diferentes materiais (NOGUEIRA, 2017). Assim, há uma diversidade de materiais que podem ser utilizados como agentes encapsulantes, como polissacarídeos (goma arábica, ágar, alginato de sódio, carragena, goma xantana, amido, maltodextrinas, sacarose, lactose, etc.), proteínas (soro de leite, gelatina, caseína, albumina, glúten, etc.), e lipídeos (cera, parafina, óleos, gorduras) (GARCIA, 2016; NOGUEIRA, 2017).

Diante do exposto, nesta revisão serão apresentados algumas das técnicas de encapsulação de bactérias probióticas utilizadas e seus princípios.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada uma revisão bibliográfica sobre o tema em revistas científicas, reunindo informações, técnicas e conceitos aplicáveis na encapsulação de probióticos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Spray *Drying* (Secagem por atomização)

Este método é amplamente utilizado por ser relativamente simples, de baixo custo operacional, de rápida execução, permitindo um fácil escalonamento e produção em larga escala, uma alta eficiência de processo, gerando um produto na forma de pó e de fácil manuseio. (CASANOVA et al., 2016; ESTEVINHO et al., 2017; GONCALVES et al., 2017).

Sendo assim, a secagem por atomização permite a redução da atividade da água, garante estabilidade microbiológica, evita processos de degradação, reduz os custos de armazenamento e transporte (ALIAKBARIAN et al., 2015).

As etapas gerais no processo de microencapsulação de bactérias probióticas por *spray drying* envolve a homogeneização das células e dos materiais de parede para criar uma emulsão. Esta é atomizada na câmara de secagem, em temperaturas elevadas, formando uma nuvem de pequenas gotículas que ao entrar em contato com o ar quente secam rapidamente, de 3 a 5 segundos, gerando pó ao final do processo. No entanto, a utilização de altas temperaturas pode ocasionar a redução da viabilidade celular do probiótico.

Polissacarídeos e proteínas são normalmente utilizados como material encapsulantes (BAKRY et al., 2016; LEE; WONG, 2014).

3.2 Coacervação

Coacervação é definida como a separação de uma solução coloidal em duas fases líquidas (BURWELL, 1976). Há dois tipos de coacervação: a simples e a complexa. A coacervação simples usa um único polímero para formar coacervatos através da adição de sal ou agente dissolventes podendo estes serem álcoois ou acetona (TIMILSENA et al., 2019). Na coacervação complexa, duas ou mais soluções poliméricas com cargas elétricas opostas interagem entre si na água resultando em duas fases líquidas imiscíveis. (DE KRUIF; WEINBRECK; DE VRIES, 2004).

Embora esta técnica seja considera complexa, cara e consumir mais tempo comparado à secagem por *spray drying*, ela oferece um risco menor aos probióticos como a utilização de temperatura ambiente, alta integridade da cápsula e excelente liberação controlada. No entanto, esta técnica produz partículas maiores (GOUIN, 2004).

3.3 Spray Chilling/Cooling (Secagem por resfriamento)

Uma mistura homogênea do material de núcleo e do material de revestimento lipídico fundido é pulverizado através de uma corrente de ar resfriado abaixo do ponto de fusão do lipídio. O ar resfriado solidifica o lipídeo em torno das partículas do núcleo. Normalmente, os materiais de revestimento são lipídeos ou seus derivados hidrofóbicos com um ponto de fusão razoavelmente alto sendo os materiais de núcleo hidrofílicos, como enzimas, vitaminas solúveis em água e probióticos (DESAI; PARK, 2005; BAMPI et al., 2016).

A secagem por resfriamento é eficiente para a encapsulação de probióticos, uma vez que se assemelha ao *spray drying*, sendo baseado na injeção de ar frio para solidificar as partículas permitindo uma maior taxa de sobrevivência celular (BAMPI et al., 2016).

3.4 Extrusão

Na extrusão, o material de núcleo é incorporado em uma massa de carboidrato fundido e, em seguida, a mistura é forçada através de uma matriz e coletada em um banho de solução desidratante (REINECCIUS, 2019).

Os materiais de parede comumente utilizados incluem a glicose, xarope de glicose, sacarose, maltodextrina e glicerina que podem ser usados de forma isolada ou misturados entre si. A principal vantagem deste método é a proteção do material de núcleo frente ao oxigênio uma vez que eles ficam completamente isolados do ar pelo material de parede (GIBBS et al., 1999).

O trabalho mais antigo usando extrusão para o encapsulamento apareceu no final da década de 1950 na indústria de aromas, conhecido como injeção por fusão (CASTRO et al., 2016). Este método apresenta condições simples e acessíveis para a produção de microcápsulas probióticas por não utilizar temperatura e solventes (ETCHEPARE et al., 2015).

4. CONCLUSÃO

De modo geral as técnicas de encapsulação são capazes de garantir a estabilidade de bactérias probióticas e de compostos sensíveis ao processamento e armazenamento. Um aspecto determinante na escolha é conhecer o comportamento do probiótico frente às condições de estresse. A partir disso, e dos conhecimentos das técnicas e dos materiais de parede, é possível realizar a encapsulação garantindo a viabilidade celular desejada.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIAKBARIAN, B.; PAINI, M.; ALBERTO, A. Effect of encapsulating agent on physicalchemical characteristics of olive pomace polyphenols-rich extracts. **Chemical Engineering Transactions**, v.43, p.97–102, 2015.

BAKRY, A. M.; ABBAS, S.; ALI, B.; MAJEED, H.; ABOUELWAFA, M. Y.; MOUSA, A.; LIANG, L. Microencapsulation of oils: A comprehensive review of benefits, techniques, and applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.15, n.1, p.143–182, 2016.

BAMPI, G. B.; BACKES, G. T.; CANSIAN, R. L.; DE MATOS JR, F. E.; ANSOLIN, I. M. A.; POLETO, B. C.; COREZZOLA, L. R.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Spray Chilling Microencapsulation of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium animalis subsp. lactis and Its Use in the Preparation of Savory Probiotic Cereal Bars. **Food and Bioprocess Technology**, v.9, p. 1422-1428, 2016.

Burwell, R. L. Definitions and terminology. In R. L. Burwel, Manual of symbols and terminology for physicochemical quantities and units. 1st ed., pp.74–86, **Pergamon**, 1976.

CARVALHO, G. R. **Avaliação de diferentes composições de material de parede na microencapsulação de óleo essencial *lemongrass***. 2017. 94 p. Dissertação. (Mestrado em Engenharia de Biomateriais) – Universidade Federal de Lavras – Lavras, 2017.

CASANOVA, F.; ESTEVINHO, B. N.; SANTOS, L. Preliminary studies of rosmarinic acid microencapsulation with chitosan and modified chitosan for topical delivery. **Powder Technology**, 297, 44–49, 2016.

CASTRO, N.; DURRIEU, V.; RAYNAUD, C.; ROUILLY, A.; RIGAL, L.; QUELLET, C. Melt extrusion encapsulation of flavors: **A review. Polymer Reviews**, v.56, n.1, p.137–186, 2016.

DE KRUIF, C. G.; WEINBRECK, F.; DE VRIES, R. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.9, n.5, p.340–349, 2004.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying. **Journal of Microencapsulation**, v.22, n.2, p.179–192, 2005.

ESTEVINHO, B. N.; LOPES, A. R.; SOUSA, V.; ROCHA, F.; NUNES, O. C. Microencapsulation of *Gulosibacter molinativorax* ON4Tcells by a spray-drying process using different biopolymers. Journal of Hazardous Materials, 338, 2017.

ETCHEPATE, M. de A.; MENEZES, M. F. da S. C. de.; BARRETO, A. R.; CAVALHEIRO, C. P.; MENEZES, C. R.de. Microencapsulação de probióticos pelo método de extrusão associado a interações eletrostáticas. **Ciência e Natura**, v. 37, p.75-86, 2015.

GARCIA, C. M. S**. Microencapsulação por Spray Drying de Compostos Bioativos de Subprodutos do Ananás**. 2016. 76 p. Dissertação. (Mestrado em Engenharia Alimentar) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2016.

GIBBS, B. F.; KERMASHA, S.; ALLI, I.; MULLIGAN, C. N. Encapsulation in the food industry: **A review. International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.50, n.3, p.213–224, 1999.

GONCALVES, B.; MOEENFARD, M.; ROCHA, F.; ALVES, A.; ESTEVINHO, B. N.; SANTOS, L. Microencapsulation of a natural antioxidant from coffee - Chlorogenic acid (3-caffeoylquinic acid). **Food and Bioprocess Technology**, v.10, n,8, 1521–1530, 2017.

GOUIN, S. Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, n.7, p.330–347, 2004.

JANISZEWSKA-TURAK, E. Carotenoids microencapsulation by spray drying method and supercritical micronization. **Food Research International**, n. 99, p.891-901, 2017.

Lee, S. J.; Wong, M. Nano-and microencapsulation of phytochemicals. In H. S. Kwak. Nano- and microencapsulation for foods. 1st ed., pp.119–165, **JohnWiley & Sons**, 2014.

NOGUEIRA, M. B. **Encapsulação e estabilidade de extratos carotenogênicos obtidos por Phaffia Rhodozyma NRRL Y17268**. 2017. 161 p. Tese. (Doutorado em Engenharia e Ciências de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, 2017.

POLETTO, G.; RADDATZ, G. C.; CICHOSKI, A. J.; ZEPKA, L. Q.; LOPES, E. J.; BARIN, J. S.; WAGNER, R.; MENEZES, C. R. de. Study of viability and storage stability of Lactobacillus acidophillus when encapsulated with the prebiotics rice bran, inulin and Hi-maize. **Food Hydrocolloids**, v.95, p.238-244, 2019.

REINECCIUS, G. Use of proteins for the delivery of flavours and other bioactive compounds. **Food Hydrocolloids**, v.86, p.62–69, 2019.

TIMILSENA, Y. P.; AKANBI, T. O.; KHALID, N.; ADHIKARI, B.; BARROW, C. J. Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.121, p.1276–1286, 2019.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

ENCAPSULAÇÃO DE PROBIÓTICOS: UMA BREVE REVISÃO SOBRE AS TÉCNICAS UTILIZADAS E SUAS CARACTERÍSTICAS

GUILHERME DA SILVA MENEGAZZI[1]; MICHELE RAMOS DUTRA ROSOLEN[2]; PATRICIA DIAZ[3]

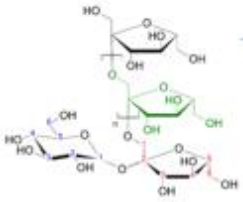
Probiótico



Fonte: Google imagens

\+

Material encapsulante

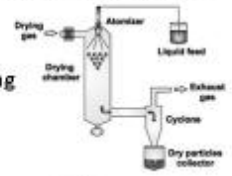


Inulina

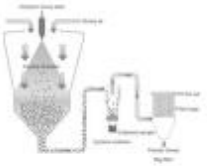


Emulsão

Spray drying



Spray chilling

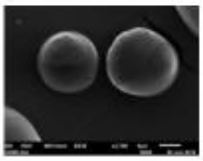


Coacervação



Extrusão





ROSOLEN et al., 2019

PURIFICAÇÃO DE XILANASES DE *Aureobasidium pullulans* CCT 1261 UTILIZANDO PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO

LUIZ CLAUDIO SIMÕES CORRÊA JUNIOR[1]; SARAH SEVERO JARDIM[2]; DYHANE BARROS COSTA[2]; GABRIELLE VICTORIA GAUTÉRIO[2];JANAINA FERNANDES DE MEDEIROS BURKERT[2]; SUSANA JULIANO KALIL[3]

[1]Universidade Federal do Rio Grande (FURG) – luizjunior.furg@gmail.com
[2]Universidade Federal do Rio Grande (FURG) – gabriellevgauterio@furg.br
[3]Universidade Federal do Rio Grande (FURG) – dqmsjk@furg.br

1. INTRODUÇÃO

As xilanases (endo-β-1,4-xilanases, E.C 3.2.1.8) são enzimas hidrolíticas envolvidas na clivagem das ligações glicosídicas internas (β-1,4) da xilana (polissacarídeo majoritário das hemiceluloses), produzindo oligômeros de xilose (xilo-oligossacarídeos, XOs) (ANAND; KUMAR; SATYANARAYANA, 2013). Essas enzimas são produzidas principalmente por micro-organismos como bactérias, fungos filamentosos e leveduras, e posteriormente podem ser aplicadas (na forma bruta ou purificada) em processos diversos, como na fabricação de papel (WALIA et al., 2017), clarificação de sucos (SHAHRESTANI et al., 2016), bem como na produção de XOs (HALTRICH et al., 1996).

Em alguns processos é indispensável a utilização de extratos de xilanases previamente purificados pois são removidas impurezas e/ou a atividade indesejável de outras enzimas presentes, como celulases (na fabricação de papel) e β-xilosidades (na produção de XOs) (DING; LI; HU, 2018). Com a enzima purificada também é possível avaliar sua atividade catalítica e sua capacidade de resposta a moléculas reguladoras que aumentam ou diminuem sua atividade (DING; LI; HU, 2018).

A purificação de proteínas por precipitação salina (*salting out)* é amplamente empregada nos estágios iniciais de purificação, pois é um método rápido, de baixo custo e de possível aumento de escala. (LEMES et al., 2019; PESSOA JR; KILIKIAN, 2005). O sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$) é o sal mais utilizado na técnica de precipitação, pois apresenta elevada solubilidade e propriedades não desnaturantes para a maioria das proteínas (WALSH, 2014).

Devido à importância da aplicação das xilanases, este trabalho tem como objetivo investigar condições para sua purificação que permita incrementar seu grau de pureza e mantenha sua atividade catalítica.

2. METODOLOGIA

O extrato de xilanases de *A. pullulans* CCT 1261 utilizado para o estudo de purificação foi produzido mediante cultivo submerso em condições de máxima produção da enzima conforme GAUTÉRIO et al. (2020). Ao final do cultivo, o meio líquido foi clarificado (centrifugação e filtração) e o sobrenadante obtido (extrato enzimático bruto) foi utilizado nos ensaios de precipitação com $(NH_4)_2SO_4$ nas concentrações de 20, 40 e 60% de saturação do sal (SCOPES, 1994).

O sal foi adicionado de forma gradual ao extrato enzimático (4 °C), sob constante agitação magnética. Após, as amostras permaneceram em repouso refrigerado por 2 h (PAL; KHANUM, 2011), e em seguida, foram centrifugadas (4757 × g, 30 min, 4 °C). O precipitado obtido foi ressuspendido em solução tampão citrato de sódio (50 mmol/L e pH 5,3) e posteriormente submetido à etapa de diálise (*overnight*) com o mesmo tampão para remover o excesso do sal. A retirada do sal foi monitorada mediante adição do reagente de Nessler à solução tamponante.

A atividade de endo-β-1,4-xilanases (BAILEY; BIELY; POUTANEN, 1992) e a concentração de proteínas solúveis (LOWRY et al., 1951) foram determinadas no extrato enzimático bruto (EB), no precipitado ressuspendido (P) e no sobrenadante (S).

A eficiência do processo de purificação foi avaliada em termos da recuperação enzimática (REC%) e do fator de purificação (FP), conforme Equações 1 e 2, respectivamente.

$$\text{REC}\ (\%) = \frac{A_s \times V_s}{A_{eb} \times V_{eb}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{FP} = \frac{AE_s}{AE_{eb}} \quad (2)$$

Onde A_s e A_{eb} representam a atividade enzimática (U/mL) de endo-β-1,4-xilanases na fração de saída e do EB, respectivamente. V_s e V_{eb} representam o volume (mL) da fração de saída e do EB, respectivamente. AE_s e AE_{eb} representam a atividade enzimática específica ($U/mg_{proteína}$) de endo-β-1,4-xilanases na fração de saída e do EB, respectivamente.

A fim de verificar diferenças significativas entre as condições estudadas, foram realizados o teste *t* ou a análise de variância (ANOVA) seguidos pelo teste de *Tukey*, ao nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão estão apresentados os resultados obtidos nos ensaios de precipitação com $(NH_4)_2SO_4$ nas diferentes concentrações estudas. É possível observar que o aumento da concentração de $(NH_4)_2SO_4$ causou um aumento significativo ($p<0,05$) na REC e no FP do precipitado ressuspendido. O Ensaio 1 mostrou que a saturação de 20% do sal é muito baixa para precipitar as xilanases, o que promoveu uma baixa REC (2,28%). A atividade recuperada aumentou de 2,28% (Ensaio 1) para 51,07% (Ensaio 3) e o FP passou de 0,63 (Ensaio 1) para 3,23 (Ensaio 3) na fração precipitada.

Como pode ser observado na Tabela 1 não existe diferença significativa entre o FP dos Ensaios 2 e 3. Dessa forma, observando simultaneamente os resultados de REC e do FP, o Ensaio 3 mostrou ser a condição mais adequada para o processo purificação.

NINAWE; KAPOOR; KUHAD (2008) precipitaram endo-β-1,4-xilanase com 60% de saturação de sulfato de amônio e recuperaram 58,9% da atividade da enzima com FP de 1,48 vezes.

Tabela 1 – Fator de purificação (FP) e recuperação enzimática (REC) obtidos na precipitação de xilanases por $(NH_4)_2SO_4$ (média ± desvio padrão, n = 3).

Saturação do sal (%)	Fração**	Concentração de proteínas (mg/mL)	Atividade enzimática (U/mL)	Atividade específica $(U/mg)_{proteína}$	REC(%)	Fator de Purificação
20 Ensaio1	EB	2,88 ± 0,04	81,30 ± 1,96	28,20 ± 0,68	100	1
	P	0,27 ± 0,04	4,75 ± 0,45	17,90 ± 0,72	$2,28^{c}$ ± 0,24	$0,63^{b}$ ± 0,03
	S	2,15 ± 0,08	59,4 ± 2,20	27,80 ± 0,40	74,50 ± 1,04	0,98 ± 0,01
40 Ensaio 2	EB	2,71 ± 0,038	73,10 ± 1,75	26,60 ± 0,80	100	1
	P	0,20 ± 0,01	27,70 ± 4,19	103,90 ± 13,30	$17,90^{b}$ ± 1,05	$3,90^{a}$ ± 1,17
	S	1,50 ± 0,02	33,2 ± 1,12	22,0 ± 1,02	48,70 ± 1,64	0,83 ± 0,04
60 Ensaio 3	EB	2,72 ± 0,04	72,80 ± 1,52	26,80 ± 1,02	100	1
	P	0,84 ± 0,02	78,70 ± 0,97	93,70± 3,39	$51,07^{a}$ ± 3,36	$3,23^{a}$ ± 0,04
	S	1,33 ± 0,02	ND*	-	-	-

*ND: não detectado; **EB: extrato bruto; P: precipitado; S: Sobrenadante. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p<0,05) pelo teste Tukey.

No estudo de LUO et al. (2016), foi possível purificar endo-β-1,4-xilanases com recuperação enzimática de 68,17% e FP de 3,21 vezes por precipitação com $(NH_4)_2SO_4$ em 60% de saturação, estando esses resultados muito próximos aos encontrados neste trabalho com mesma saturação de sal.

De acordo com ŁOJEWSKA et al. (2016), o objetivo da precipitação de proteínas em uma única etapa é selecionar a concentração do agente precipitante em que apenas as proteínas contaminantes precipitam e não molécula alvo. Conhecer o perfil de solubilidade da enzima de interesse frente ao agente precipitante em diferentes concentrações permite estabelecer a melhor faixa de concentração de sal para posterior precipitação de forma fracionada (ou em dois estágios). No primeiro estágio de precipitação remove-se a maior parte de proteínas contaminantes (menos solúveis) e no segundo estágio a concentração do agente precipitante é suficiente para precipitar a maior parte da enzima de interesse.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados do FP e REC a saturação de sulfato de amônio de 60% mostrou ser a concentração mais adequada para a precipitação de xilanases, uma vez que uma maior quantidade da enzima foi recuperada no precipitado e um aumento no fator de purificação foi alcançado. A partir deste estudo foi possível conhecer o comportamento de precipitação da enzima de interesse, o que permitirá a escolha de uma faixa ideal de concentração de sal para posterior purificação por precipitação de forma fracionada.

Agradecimentos: Capes (código de financiamento 001), CNPq (Bolsa PIBIC).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANAND, A.; KUMAR, V.; SATYANARAYANA, T. Characteristics of thermostable endoxylanase and β-xylosidase of the extremely thermophilic

bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* TSAA1 and its applicability in generating xylooligosaccharides and xylose from agro-residues. **Extremophiles**, v. 17, n. 3, p. 357–366, 2013.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 257–270, 1992.

DING, C.; LI, M.; HU, Y. High-activity production of xylanase by *Pichia stipitis*: Purification, characterization, kinetic evaluation and xylooligosaccharides production. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 72–77, 2018.

GAUTÉRIO, G. V.; DA SILVA, L. G. G.; HÜBNER, T.; DA ROSA RIBEIRO, T.; KALIL, S. J. Maximization of xylanase production by *Aureobasidium pullulans* using a by-product of rice grain milling as xylan source. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 23, n. 101511, 2020.

HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D.; STEINER, W.; ŽUPANČIČ, S. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, v. 58, n. 2, p. 137–161, 1996.

LEMES, A. C.; SILVÉRIO, S. C.; RODRIGUES, S.; RODRIGUES, L. R. Integrated strategy for purification of esterase from *Aureobasidium pullulans*. **Separation and Purification Technology**, v. 209, n. July 2018, p. 409–418, 2019.

ŁOJEWSKA, E.; KOWALCZYK, T.; OLEJNICZAK, S.; SAKOWICZ, T. Extraction and purification methods in downstream processing of plant-based recombinant proteins. **Protein Expression and Purification**, v. 120, p. 110–117, 2016.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

LUO, L.; CAI, J.; WANG, C.; LIN, J.; DU, X.; ZHOU, A.; XIANG, M. Purification and characterization of an alkaliphilic endo-xylanase from *Streptomyces althioticus* LMZM and utilization in the pulp paper industry. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 91, n. 4, p. 1093–1098, 2016.

NINAWE, S.; KAPOOR, M.; KUHAD, R. C. Purification and characterization of extracellular xylanase from *Streptomyces cyaneus* SN32. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 5, p. 1252–1258, 2008.

PAL, A.; KHANUM, F. Purification of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5: Individual and interactive effect of temperature and pH on its stability. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 4, p. 879–887, 2011.

PESSOA JR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. Barueri, SP: Manole, 2005.

SCOPES, R. K. **Protein Purification: Principles and Practice**. Boston: Springer-Verlag, 1994.

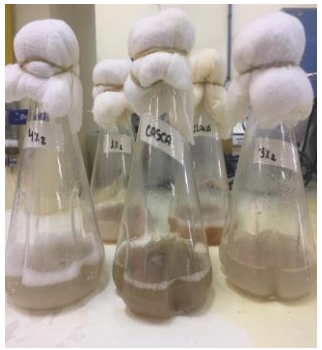
WALIA, A.; GULERIA, S.; MEHTA, P.; CHAUHAN, A. Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.

WALSH, G. **Proteins: biochemistry and biotechnology.** Reino Unido: Wiley & Sons, 2014.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

PURIFICAÇÃO DE XILANASES DE *Aureobasidium pullulans CCT 1261* UTILIZANDO PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO

LUIZ CLAUDIO SIMÕES CORRÊA JUNIOR[1]; SARAH SEVERO JARDIM[2]; DYHANE BARROS COSTA[2]; GABRIELLE VICTORIA GAUTÉRIO[2]; JANAINA FERNANDES DE MEDEIROS BURKERT[2]; SUSANA JULIANO KALIL[3]
[1,2,3]**Universidade Federal do Rio Grande - FURG**



Cultivo submerso para produção de xilanases



Concentrações estudadas: 20% 40% 60%

Precipitação com sulfato de amônio



Centrifugação



Diálise

Espectrofotometria



Atividade enzimática de xilanases e concentração proteínas solúveis



Estimativa eficiência do processo e análise estatística

Melhor condição de purificação:

60% saturação sulfato de amômio

Fator de Purificação (FP) = 3,14

Recuperação enzimática (%REC) = 51%

EXTRATOS AQUOSOS DE *Lentinula edodes*, *Pleurotus pulmonaris* E *Pleurotus sajor-caju*: ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE EXOENZIMA DE *Candida albicans*

MORGANA LÜDTKE AZEVEDO[1]; CAROLINA LAMBRECHT GONÇALVES[2]; ALESSANDRO MENNA ALVES[3]; CAROLINA WILLE[3]; PATRÍCIA DA SILVA NASCENTE[2]; RAFAEL GUERRA LUND[1,3]

[1]Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, CCQFA, UFPel - morganaludtke@gmail.com
[2]Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Microbiologia, UFPel
[3]Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, UFPel – rafael.lund@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, extratos e metabólitos de cogumelos já utilizados têm se mostrado capazes de contribuir para o tratamento de uma variedade de doenças. Cogumelos medicinais, especialmente os pertencentes a basidiomicetos superiores, como carvalho (*Lentinula edodes*) e cogumelos ostra (espécies de *Pleurotus*), destacam-se como importantes reservatórios de compostos bioativos com múltiplas propriedades terapêuticas (AL-BAHRANI et al., 2017).

A procura por tais compostos, com o objetivo de controlar infecções microbianas, aumentou expressivamente nos últimos anos. Esta busca, por sua vez, é justificada pelo atual uso indiscriminado de antibióticos que resulta na resistência de microrganismos a diferentes medicamentos (CORRÊA; HELENO, 2020).

Ademais, recentemente, na literatura, tem sido reportada a resistência de *Candida albicans* e outras espécies de mesmo gênero contra alguns antifúngicos (WHALEY et al., 2017). *C. albicans* são membros comensais da cavidade oral da maior parte da população. Entretanto, podem causar infecções em humanos quando o organismo está em desequilíbrio devido a fatores locais ou sistêmicos (DELAVY et al., 2020).

Além dos fatores do organismo hospedeiro, é necessário que esses microrganismos usem diversos mecanismos para colonizar as células epiteliais e evadir do sistema imune. E dentre esses mecanismos, pode-se destacar a produção de enzimas extracelulares, como proteinase e fosfolipase (BACH et al., 2017).

Dessa maneira, se faz necessária a adoção de métodos alternativos para o controle de infecções bacterianas e fúngicas. Portanto, os objetivos desse estudo foram avaliar a atividade de extratos de cogumelos pertencentes às espécies *Lentinula edodes* (SHI), Pleurotus pulmonarius (PUL) e *Pleurotus sajor-caju* (PSC) contra oito espécies de leveduras e avaliar a produção de proteinase e fosfolipase em amostras de Candida spp.

2. METODOLOGIA

2.1 Condições de cultura dos cogumelos e preparo dos extratos filtrados

Os cogumelos foram cultivados no Laboratório de Micologia (Departamento de Microbiologia e Parasitologia, IB, UFPel). Após serem coletados para extração, os basidiomicetos foram lavados e então levados à estufa, onde permaneceram por 15 dias a 35 °C para secagem total até que estivessem prontos para uso.

Em seguida, após secos, os cogumelos foram moídos por um minuto (50 g de cogumelos / 1 L de água destilada). A mistura resultante foi refrigerada a 4 °C por 24 h, filtrada, e por fim centrifugada a 5000 g a 4 °C por uma hora. O sobrenadante foi filtrado através do papel filtro Whatman n° 1 e membrana de Acetato de celulose de 0.45 e 0.25 micrometros em condições assépticas em fluxo laminar.

2.2 Exposição das amostras de *Candida* aos extratos filtrados

Foram coletadas amostras de *C. albicans* do palato de indivíduos com estomatite para avaliar a atividade extracelular das enzimas proteinase e fosfolipase. Os espécimes foram semeados no meio Ágar de dextrose Sabouraud (SDA) com 0.2 mg / mL de cloranfenicol e incubados a 37 °C por até 48 h.

Adaptando a metodologia M27 A3 do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI), os extratos foram testados puros e diluídos (50%) por microdiluição em caldo. O antifugigrama foi realizado com os extratos nas diluições 1:2 e 1:4 contra *C. sake*, *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. globose*.

2.3 Avaliação da atividade extracelular das enzimas proteinase e fosfolipase

Para avaliar a atividade de ambas enzimas, as amostras de *C. albicans* foram testadas em triplicata. O meio utilizado para o ensaio da proteinase foi o SDA contendo 57.3 g de cloreto de cálcio e 100 mL de gema de ovo enriquecida e estéril por litro de água destilada. Enquanto que o o meio utilizado para o ensaio da fosfolipase foi o Ágar BSA (albumina sérica bovina) contendo 5 g de BSA, 1.45 de YNB (base de nitrogênio de levedura), 20 g de glicose e 20 g de Ágar-Ágar por litro de água destilada.

Todas as amostras de leveduras foram cultivadas em SDA 4% por 24 h. Em seguida, foram diluídas em água destilada na escala 05. de McFarland, e 20 µl de cada amostra foi aplicado nos meios de ensaio. As placas foram incubadas a 37 °C por 72h. Atividade enzimática foi determinada pela formação de um halo ao redor da colônia de leveduras e mensurada pela divisão = diâmetro da colônia/diâmetro da colônia + zona de precipitação (Zp), de acordo com o método descrito por PRICE et al. (1982).

Logo, os valores obtidos determinaram o grau de atividade enzimática de *C. albicans*: alta atividade (valores menores que 0.63), baixa atividade (valores entre 0.99 a 0.64) e nenhuma atividade (valores iguais a 1.00)

2.4 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados por meio do teste t de Student e ANOVA, utilizando, para ambos, SigmaStat 3.5 para determinar se a diferença estatística foi calculada considerando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a leitura dos resultados, foi observado que a cepa *C. parapsilosis* foi sensível aos extratos de SHI na diluição 1: 2, PUL, PSC e SHI na diluição 1: 4. Uma amostra de *C. globosa* foi sensível ao SHI nas diluições 1: 2 e 1: 4 e ao PUL na diluição 1: 2. Outro espécime de *C. globosa* foi sensível apenas ao PSC na diluição 1: 2. Já *C. sake* e *C. albicans* não mostraram sensibilidade a nenhum dos três extratos em qualquer diluição.

De um total de 81 cepas isoladas das amostras, a maioria foi identificada com *C. albicans* (n=70). E dentre essas, todas amostras de *C. albicans* apresentaram altos níveis de produção de proteinase, com valores de Zp entre 0.167 e 0.581. Enquanto isso, a produção de fosfolipase foi observada em 55 cepos de *C. albicans*, com valores de Zp entre 0.422 e 0.905. As 11 cepas não-albicans também mostraram altos níveis de produção de proteinase, com valores de Zp entre 0.271 e 0.391. A produção de fosfolipase foi observada em apenas 4 cepas não-albicans (2 *parapsilosis*, 1 *lipolytica* e 1 *tropicalis*). Os valores médios de produção de fosfolipase e proteinase, de acordo com as espécies, são mostrados na Tabela 1.

Table 1: Average values of proteinase and phospholipase production, according to species.

Species	Proteinase Production (Pz) (media±DP)	Phospholipase production (Pz) (media±DP)
C. albicans (n=70)	0,327±0,083	0,663±0,118
C. parapsilosis (n=5)	0,272±0,037	0,756±0,036
C. lipolytica (n=2)	0,325±0,065	0,743±0,050
C. guilliermondii (n=2)	0,331±0,039	-
C. glabrata (n=1)	0,342±0,016	-
C. tropicalis (n=1)	0,246±0,025	0,663±0,015

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos trouxeram novas perspectivas sobre a utilização de fungos macroscópicos patogênicos para humanos e animais, visto que o uso de cogumelos como antimicrobiano, principalmente antifúngico, tem se destacado como uma possível alternativa, já que vários deles podem produzir metabólitos tóxicos a outros microrganismos e seus subprodutos.

Os extratos de cogumelos testados apresentaram atividade antimicrobiana, entretanto frente a , apenas, algumas das cepas discutidas ao longo do estudo. Assim, estudos complementares são necessários para melhor avaliar o mecanismo de ação da atividade antimicrobiana de tais cogumelos, bem como o efeito inibitório das enzimas proteinase e fosfolipase pelos extratos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-BAHRANI, R., RAMAN, J., LAKSHMANAN, H., HASSAN, A. A., SABARATNAM, V. Green synthesis of silver nanoparticles using tree oyster mushroom Pleurotus ostreatus and its inhibitory activity against pathogenic bacteria. **Materials Letters**, Iraque, 186, 21-25, 2017.

BACH, F., HELM, C. V., BELLETTINI, M. B., MACIEL, G. M., HAMINIUK, C. W. I. Edible mushrooms: a potential source of essential amino acids, glucans and minerals. **International Journal of Food Science & Technology**, Brasil, 52(11), 2382-2392, 2017.

CORRÊA, R. C., HELENO, S. A., ALVES, M. J., FERREIRA, I. C. Bacterial Resistance: Antibiotics of Last Generation used in Clinical Practice and the Arise of Natural Products as New Therapeutic Alternatives. **Current Pharmaceutical Design**, Portugal, 26(8), 815-837, 2020.

DELAVY, M., CERUTTI, L., CROXATTO, A., PROD'HOM, G., SANGLARD, D., GREUB, G., COSTE, A. T. Machine learning approach for candida albicans fluconazole resistance detection using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Frontiers in Microbiology**, Suíça, 10, 3000, 2020.

PRICE, M. F., WILKINSON, I. D., GENTRY, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in Candida albicans. **Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology**, EUA, 20(1), 7-14, 1982.

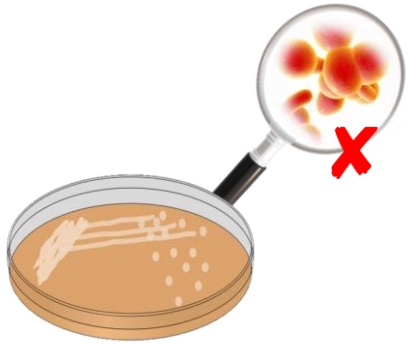
WHALEY, S. G., BERKOW, E. L., RYBAK, J. M., NISHIMOTO, A. T., BARKER, K. S., ROGERS, P. D. Azole antifungal resistance in Candida albicans and emerging non-albicans Candida species. **Frontiers in microbiology**, EUA 7, 2173, 2017.

EXTRATOS AQUOSOS DE *Lentinula edodes*, *Pleurotus pulmonaris* E *Pleurotus sajor-caju*: ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE EXOENZIMA DE *Candida albicans*



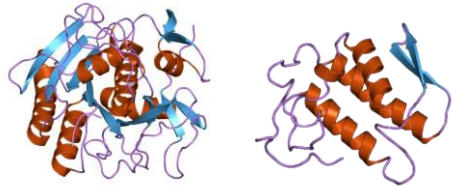
Lentinula edodes
Pleurotus pulmonarius
Pleurotus sajor-caju

Extratos aquosos filtrados



Determinação da Concentração Inibitória Mínima *Candida* spp.

Determinação dos fatores de virulência:
Atividade Enzimática
Proteinase e **Fosfolipase**



Produção de xilo-oligossacarídeos a partir da hidrólise enzimática de xilana bruta e pré-tratada com ultrassom

Nathiéli Bastos de Souza[1]; Dyhane Barros Costa[2]; Gabrielle Victoria Gautério[3]; Susana Juliano Kalil[4]

[1]Universidade Federal do Rio Grande – eng.nathielisouza@gmail.com
[2]Universidade Federal do Rio Grande – dyhane@hotmail.com
[3]Universidade Federal do Rio Grande - gabriellevgauterio@gmail.com
[4]Universidade Federal do Rio Grande – dqmsjk@furg.br

1. INTRODUÇÃO

Xilo-oligossacarídeos (XOs) são compostos formados pela quebra da cadeia da xilana, compostos basicamente de 2 a 10 unidades de xilose unidas por ligações β-1,4 e com proporções variadas de substituintes laterais como grupos acetila, ácidos urônicos e arabinoses (MONIZ et al., 2016). XOs de baixo grau de polimerização (GP) ≤ 5 não são metabolizáveis pelo organismo humano e por vezes apresentam função prebiótica, promovendo a colonização da microflora intestinal benéfica (SINGH; BANERJEE; ARORA, 2015). Por este motivo, açúcares com essa propriedade têm despertado o interesse para a aplicação na indústria alimentícia, visto que funcionam como aditivos ou adoçantes em dietas (NIETO DOMÍNGUEZ et al., 2017). Porém, para aplicação dos XOs é necessário conhecer a sua estrutura, o seu GP, as suas propriedades biológicas e funcionais, entre outras (CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012).

A hidrólise enzimática é o método mais utilizado na produção de XOs, pois a ação de endo-β-1,4-xilanase não produz subprodutos indesejáveis durante a reação, não necessita de equipamentos especiais e acontece em condições amenas de pH e temperatura (GAUTÉRIO et al., 2018; RAJAGOPALAN; SHANMUGAVELU; YANG, 2017). Para uma hidrólise enzimática eficiente faz-se necessária a avaliação de alguns parâmetros (AZELEE et al., 2016) tais como o pré-tratamento do substrato (xilana), o qual pode proporcionar maior liberação de oligômeros durante a hidrólise. Até o presente momento, não foram encontrados estudos envolvendo o uso do ultrassom como técnica de pré-tratamento da xilana para posterior produção de XOs. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar a produção de XOs a partir da hidrólise enzimática da xilana bruta (não tratada) e da xilana pré-tratada com ultrassom.

2. METODOLOGIA

Para a hidrólise enzimática foi utilizado um extrato enzimático de xilanase produzido por *A. pullulans* CCT 1261 em cultivo submerso, conforme SOUZA (2020). Foram utilizadas duas xilanas de madeira de faia, ambas solubilizadas em tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0, uma bruta (sem tratamento) – Ensaio 1, e outra xilana pré-tratada – Ensaio 2, através de ondas ultrassônicas, para tal, foi aplicada a solução de xilana uma intensidade ultrassônica de 5 W/mL por 5 min, condição estudada por SOUZA (2020).

Os ensaios de hidrólises enzimáticas foram realizados sob os seguintes parâmetros reacionais: 1% (m/v) de xilana (com ou sem pré-tratamento),

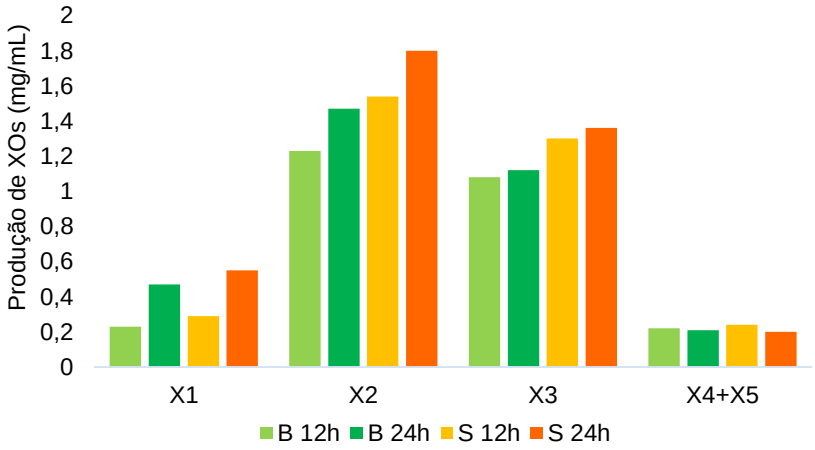
proporção enzima/substrato de 300 U/g, 45 °C, 180 rpm (AACHARY; PRAPULLA, 2009).

Todas as hidrólises foram realizadas em triplicata de ensaios em incubadora com agitação orbital em frascos de 125 mL e volume reacional de 50 mL. A amostragem foi realizada nos tempos de 0 12 e 24 h de hidrólise GAUTÉRIO (2020). Para todos os tempos reacionais, a amostra foi submetida à 100 °C em banho fervente por 5 min para inativação da enzima, e posterior banho de gelo por 5 min. Todas as amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação do teores de XOs e xilose no hidrolisado, além da determinação do GP dos XOs (AACHARY; PRAPULLA, 2009). Aos resultados de produção de XOs totais foi utilizado teste de diferença de médias, comparadas pelo teste Tukey a 5% de significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 e a Tabela 1 mostram o perfil de carboidratos e os teores de produção de XOs, respectivamente, resultantes da hidrólise enzimática de xilana bruta e pré-tratada com ultrassom. Conforme mostra a Tabela 1, o pré-tratamento ultrassônico da xilana ocasionou um aumento significativo ($p<0,05$) na produção de XOs.

Figura 1 – Perfil de carboidratos resultantes da hidrólise enzimática de xilana bruta e xilana pré-tratada com ultrassom.



*__Nota:__ Entende-se: X1: xilose; X2: xilobiose; X3: xilotriose; X4: xilotetraose; X5: xilopentose; B 12h e B 24h: Xilana bruta com 12 e 24 h de hidrólise; S 12h e 24h: Xilana sonicada com 12 e 24 h de hidrólise.

Na Figura 1, observa-se o aumento expressivo no conteúdo de X2 e X3 após o pré-tratamento ultrassônico da xilana, representando em média 45,95±0,15% e 34,87±0,15%, respectivamente, do total de carboidratos hidrolisados, com rendimento total de XOs de 85,93%. Segundo Singh et al. (2015), os XOs de GP 2 e 3 são os mais adequados para preparações alimentícias, visto que seu potencial prebiótico é maior.

Observa-se aumento de 20% na produção de XOs totais, passando de 2,80 para 3,36 mg/mL, com o pré-tratamento com ultrassônico na xilana em 24 h de reação. O pré-tratamento aplicado, proporcionou ainda aumento na conversão de xilana em XOs, passando de 28,0% na xilana bruta para 33,6% na xilana pré-tratada em 24 h de hidrólise. O aumento na produção de XOs pode ter ocorrido

devido à modificação estrutural da xilana após o tratamento ultrassônico, possibilitando assim maior ação enzimática sobre esta.

Tabela 1 - Produção de XOs a partir da hidrólise enzimática de xilana bruta e xilana pré-tratada com ultrassom.

Xilana	Amostras (h)	∑X2+…+X5 (mg/mL)
Bruta	0	0,79±0,04 [e]
	12	2,54±0,03 [d]
	24	2,80±0,03 [c]
Pré-tratada	0	0,62±0,07 [f]
	12	3,08±0,03 [b]
	24	3,36±0,01 [a]

*__Nota:__ Letras iguais indicam que não há diferença estatística ao nível de 5% de significância em teste Tukey. Entende-se: X1: xilose; X2: xilobiose; X3: xilotriose; X4: xilotetraose; X5: xilopentose; ∑X2+…+X5: Somatório de XOs de GP 2, 3, 4 e 5 (XOs totais)

O efeito do tratamento ultrassônico provavelmente ocasiona modificações na cadeia da xilana facilitando o acesso da enzima a este substrato. Fato que condiz com o observado por Dalagnol (2010), pois segundo o autor, quando aplicado ao substrato, cria aberturas na superfície da molécula, resultado do impacto mecânico da cavitação, favorecendo a ação da enzima e reduzindo o tempo de processo necessário. Quando o autor testou a pré-sonicação do substrato antes da atividade enzimática, observou maior atividade da xilanase com o pré-tratamento e conclui que o ultrassom deve ter agido na cadeia da xilana reduzindo seu tamanho ou causando desdobramentos na molécula que facilitaram o acesso da enzima.

No presente estudo, a redução do tempo de hidrólise também pode ser observada, uma vez que o teor de XOs obtido em 12 h de hidrólise de xilana pré-tratada (3,08 mg/mL) foi significativamente maior quando comparado ao obtido em 24 h de hidrólise de xilana bruta (2,80 mg/mL). Em outras palavras, o pré-tratamento ultrassônico da xilana proporcionou maior produção de XOS em menor tempo de processo.

Até o presente momento não foram encontrados estudos envolvendo o pré-tratamento ultrassônico da xilana para posterior produção de XOs. No entanto, o estudo mostrou a eficiência deste pré-tratamento no aumento da concentração de XOs e redução do tempo de processo.

4. CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que o pré-tratamento ultrassônico da xilana aumenta em 20% a produção de XOs totais, produzindo em média 3,36 mg/mL de XOs com grau de polimerização de 2 a 5. O processo de pré-tratamento proporcionou ainda, uma maior hidrólise de XOs de menor GP, X2 e X3 representando 80,8% dos oligômeros hidrolisados, açúcares esses com possível potencial prebiótico.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq (códigos de financiamento 423285/2018-1 e 304857/2018-1), Capes (código de financiamento 001) e ao PIBIC/CNPq, agradecimentos pelo apoio financeiro.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACHARY, A. A.; PRAPULLA, S. G. Value addition to corncob: Production and characterization of xylooligosaccharides from alkali pretreated lignin-saccharide complex using *Aspergillus oryzae* MTCC 5154. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 991–995, jan. 2009.

AZELEE, N. I. W. et al. High xylooligosaccharides (XOS) production from pretreated kenaf stem by enzyme mixture hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 81, p. 11–19, 1 mar. 2016.

CHAPLA, D.; PANDIT, P.; SHAH, A. Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 215–221, 2012.

DALAGNOL, L. M. G. **Avaliação do uso do ultrassom na extração do mosto de uva *Cabernet sauvignon* e na atividade enzimática**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

GAUTÉRIO, G. V. et al. Production of xylanolitic enzymes and xylooligosaccharides by *Aureobasidium pullulans* CCT 1261 in submerged cultivation. **Industrial Crops and Products**, v. 125, p. 335–345, 2018.

GAUTÉRIO, G. V. **Produção e caracterização de enzimas xilanolíticas e xilo-oligossacarídeos a partir de substratos agroindustriais.** 2020. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande.

MONIZ, P. et al. Assessment of the bifidogenic effect of substituted xylo-oligosaccharides obtained from corn straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 466–473, 2016.

NIETO DOMÍNGUEZ, M. et al. Prebiotic effect of xylooligosaccharides produced from birchwood xylan by a novel fungal GH11 xylanase. **Food Chemistry**, v. 232, p. 105–113, 2017.

RAJAGOPALAN, G.; SHANMUGAVELU, K.; YANG, K. L. Production of prebiotic-xylooligosaccharides from alkali pretreated mahogany and mango wood sawdust by using purified xylanase of *Clostridium strain* BOH3. **Carbohydrate Polymers**, v. 167, p. 158–166, 2017.

SINGH, R. D.; BANERJEE, J.; ARORA, A. Prebiotic potential of oligosaccharides: A focus on xylan derived oligosaccharides. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, n. 1, p. 19–30, jan. 2015.

SOUZA, N. B. **Maximização da produção de endo-β-1,4-xilanase por *Aureobasidium pullulans* CCT 1261 e aplicação do extrato enzimático na síntese de xilo-oligossacarídeose clarificação de suco**. 2020. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE XILANA DE MADEIRA DE FAIA BRUTA E TRATADA COM ULTRASSOM

NATHIÉLI BASTOS DE SOUZA[1]; DYHANE BARROS COSTA[2]; GABRIELLE VICTÓRIA GAUTÉRIO[3]; SUSANA JULIANO KALIL[3]



Extrato enzimático bruto



Xilana de madeira de faia



Xilana Pré-tratada com ultrassom

Ensaio 1

Ensaio 2



Hidrólise enzimática
(xilana bruta ou xilana pré-tratada)



Quantificação de carboidratos no hidrolisado

Ensaio 2

- Produção de XOs com pré-tratamento na xilana
- Conversão de xilana em XOS 33,6%
- Tempo de hidrólise

CARACTERIZAÇÃO DO ISOLADO ONP131 DE *MONILIELLA MEGACHILIENSIS* PARA PRODUÇÃO DE CERVEJA

RENAN EUGÊNIO ARAUJO PIRAINE[1]; DAVID J. SUN[2]; MATT WISLEY[3]; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE[4]; MATTHEW L. BOCHMAN[5]

[1]*Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - Universidade Federal de Pelotas - renanbiotec@gmail.com*
[2]*Department of Molecular and Cellular Biochemistry – Indiana University Bloomington - djsun@iu.edu*
[3] *Innovation and R&D – Upland Brewing Company – matt@uplandbeer.com*
[4] *Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Universidade Federal de Pelotas – fleivasleite@gmail.com*
[5]*Department of Molecular and Cellular Biochemistry – Indiana University Bloomington - bochman@indiana.edu*

1. INTRODUÇÃO

O mercado cervejeiro atual demanda cada vez mais novos produtos e tecnologias. Cervejas produzidas com ingredientes locais, novos *flavors*, de baixa caloria e com baixo ou nenhum teor de álcool são uma tendência do mercado. Restringir a diversidade microbiana a apenas *Saccharomyces cerevisiae* na produção de cerveja limita as características sensoriais e reduz a complexidade do produto final (STEENSELS; VERSTREPEN, 2014). Este fato pode ser contornado pela aplicação de diferentes cepas de leveduras e bactérias comercialmente disponíveis, ou então presentes em diferentes ambientes tais como na superfície de frutas ou no interior de barris de maturação (DE ROOS; VAN DER VEKEN; DE VUYST, 2019; SPITAELS et al., 2014). Assim, produtores em larga-escala têm buscado a utilização de leveduras não-convencionais como alternativas para obter novos *flavors*, texturas, acidez, controle de contaminação, entre outras características (STEENSELS; VERSTREPEN, 2014).

A bioprospecção de novas leveduras depende principalmente de características como a tolerância ao etanol, consumo de diferentes açúcares (ex: maltose, frutose, maltotriose), atenuação, sobrevivência em meios com pH ácido, entre outros (OSBURN; AHMAD; BOCHMAN, 2016). Microrganismos podem ser isolados a partir de sua forma selvagem e aplicados na fermentação alcoólica, dependendo apenas da sua domesticação, como ocorrido com *S. cerevisiae* há milhares de anos (LEE et al., 2011; STEENSELS et al., 2019). Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar o potencial para fermentação de cerveja do isolado da levedura selvagem *Moniliella megachiliensis*.

2. METODOLOGIA

2.1. Isolamento e identificação das leveduras selvagens

Quinze amostras compreendendo solo, raízes, cascas de árvores, folhas e flores foram coletadas no Olympic National Park (Port Angeles, Washington, US) em Agosto de 2019. Uma parte de cada amostra foi extraída e inoculada em meio YPM8E5 (10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone, 80 g/L maltose, 5% etanol

(v/v), 50 g/mL kanamycin, 50 g/mL chloramphenicol). As amostras foram incubadas sob agitação durante 72 h a 30 °C. Foram utilizados 10 uL de cada amostra para o isolamento em meio Wallerstein Laboratory Nutrient agar (WLN), sendo as placas incubadas sobre as mesmas condições anteriores.

A partir do cultivo de cada isolado em meio YPD líquido, 200 uL foram utilizados para extração do DNA genômico. Foi utilizado 0,5 uL de gDNA como template para a reação de PCR com os primers NL1 (5' - GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4 (5' – GGTCCGTGTTTCAAGAC GG - 3') para o domínio variável (D1/D2) de 26S rDNA, o qual resulta na amplificação de um fragmento de em torno 600 bp. Os fragmentos amplificados foram purificados, quantificados e submetidos ao sequenciamento pela empresa ACGT, Inc (Wheeling, IL). O resultado do sequenciamento foi analisado e comparado quanto a homologia de sequências do banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando a ferramenta *nucleotide* BLAST, disponível em https://blast.ncbi.nlm.nih.gov.

2.2. Análise filogenética

O sequenciamento de cada uma das sequências amplificadas do domínio D1/D2 do gene 26S rDNA foi utilizado para a análise das relações filogenéticas entre as leveduras selvagens, utilizando o software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) v. 10.1.7 (https://www.megasoftware.net/) para o alinhamento, construção e visualização da árvore filogenética. O alinhamento das sequências foi realizado com o uso da ferramenta ClustalW, e a árvore filogenética usando o método Bootstrap com 1000 replicações, a partir do método estatístico Neighbor-joining.

2.3. Testes de fermentação

As leveduras isoladas *Yamadazyma scolyti, Debaryomyces hansenii, Starmerella riodocensis* e *Moniliella megachiliensis* foram cultivadas em dois tubos até a obtenção de aproximadamente $1x10^9$ cells/mL. Um dos tubos foi utilizado para testar a fermentação de 400 mL de extrato de malte 100% Pilsner, densidade 1.040 g/cm³ e pH 5.4, enquanto o segundo tubo foi utilizado para testar a fermentação de 400 mL de mosto de cerveja IPA (India Pale Ale), 1.049 g/cm³, pH 5.5, 80 IBU, produzido e fornecido pela cervejaria Upland Brewery Company (Bloomington, Indiana,US). Os frascos foram mantidos sem agitação, com air-lock para saída do CO_2 originado da fermentação, durante 14 dias a aproximadamente 23 °C.

2.4. Avaliação das características importantes de *Moniliella megachiliensis* para fermentação de cerveja

Os testes para caracterização da levedura *Moniliella megachiliensis* isolado ONP131 foram realizados em placas de 96-well, em triplicata, em três

independentes experimentos. Para cada well, 100 uL da diluição em D.O.$_{660nm}$ 0.06 de *Moniliella megachiliensis* ou *Saccharomyces cerevisiae* WLP001 (White Labs, San Diego, CA) foi misturado com 100 uL do meio em teste, na concentração de 2x, e sobreposto com óleo mineral para evitar a evaporação. A curva de crescimento foi acompanhada durante 48 h a 30 °C, através de leituras da densidade óptica a cada 15 min no Synergy H1 Plate Reader (Biotek, Winooski, VT) com o Gen5 Microplate Reader and Imager Software (Biotek, Winooski, VT).

O consumo de diferentes carboidratos foi testado a partir das concentrações de 2% glucose (p/v), 2% maltose (p/v) e 2% sucrose (p/v), enquanto a tolerância ao estresse osmótico foi avaliado utilizando-se as concentrações de 10%, 20% e 30% de glucose (p/v), e 5%, 10%, 20% e 30% de maltose (p/v). Todas as condições anteriores foram analisadas com YP como base para formulação do meio. Ainda, a tolerância a salinidade no meio foi testada utilizando YPD + 0.5%, 1%, 5% e 10% (p/v) de NaCl. A capacidade das leveduras suportarem etanol foi avaliada a partir das concentrações de 2%, 4%, 5%, 6%, 8%, 10% e 15% (v/v) de etanol adicionado no meio YPD. Como controle, foi realizado o teste utilizando apenas YPD para avaliação da curva de crescimento das cepas.

A capacidade de crescimento em diferentes pHs foi avaliada a partir da incubação de *M. megachiliensis* em meios YPD de pHs ácidos 2.5, 3.0, 3.5, 5.0 e pH básico de 8.0, ajustados com HCl 1M e NaOH 2M. Ainda, houve a avaliação de capacidade de crescimento nos mesmos pHs com ajuste sendo realizado com Ácido Lático 85%. A habilidade de tolerar diferentes concentrações de α-acids and β-acids – compostos presentes no lúpulo e que possuem atividade antimicrobiana - foi avaliada a partir do uso das concentrações de 10 ppm até 200 ppm de isomerized hop extract 30% (Hopsteiner, Mainburg, Germany) e 100 ppm a 200 ppm de Beta Bio 45% (Hopsteiner, Mainburg, Germany). Por fim, a curva de crescimento durante a incubação a 37 °C também foi avaliada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de PCR foi capaz de amplificar um fragmento de 597 pb correspondendo ao basidiomiceto *M. megachiliensis* em duas amostras do Olympic National Park. Essas leveduras formaram colônias com margens filamentosas, células com aproximadamente duas vezes o tamanho de *S. cerevisiae* WLP001 e que geralmente estão dispostas em agregados celulares. Ainda, após 72 h de crescimento em meio de cultivo sólido, as colônias apresentaram coloração preta.

O isolado ONP131 foi capaz de realizar uma atenuação aparente entre 40 e 50% nos mostos fermentados, com pH final entre 4.05 a 4.28 em ambos os testes. Em uma análise sensorial simples, aromas como esterificado e fenólico puderam ser notados. Essas características demonstram sua adaptabilidade ao meio de fermentação, destacando também sua influência positiva nos *flavors* produzidos. Essa foi a primeira vez que o potencial da levedura na fermentação

de cerveja foi avaliado; na literatura há apenas o destaque para sua utilização em processos fermentativos que visam a obtenção de eritritol (adoçante).

A fase de crescimento exponencial em meio YPD foi alcançada mais rápido (~7h) que o observado para *S. cerevisiae* (12h), no entanto *S. cerevisiae* alcança uma maior densidade celular final. A levedura selvagem foi capaz de crescer em meios contendo somente sacarose ou maltose como fonte de carbono, tolerar concentrações até 30% de glicose ou maltose, etanol e NaCl até a concentração de 5%, e não demonstrou ter seu crescimento afetado nas maiores concentrações de α-acids e β-acids. *M. megachiliensis* foi capaz de crescer em meios com pH em torno de 2.5, o que desperta o interesse em seu uso para cervejas ácidas. A habilidade de tolerar a incubação a 37 °C faz da levedura uma boa opção para processos que dependam de temperaturas mais altas.

4. CONCLUSÕES

Em conclusão, foi possível isolar a levedura *M. megachiliensis* de amostras do ambiente, caracterizá-la quanto sua capacidade metabólica de diferentes carboidratos e avaliar pela primeira vez sua tolerância à condições de estresse, às quais as leveduras são expostas em fermentações de cerveja. Como perspectivas futuras, o grupo tem como objetivo produzir uma cerveja utilizando o isolado ONP131, buscando confirmar o perfil sensorial atribuído pela levedura *M. megachiliensis* quando utilizada como única levedura e quando aplicada em processos de fermentação mista com outras leveduras e bactérias.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DE ROOS, J.; VAN DER VEKEN, D.; DE VUYST, L. The interior surfaces of wooden barrels are an additional microbial inoculation source for lambic beer production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 1, p. 1–18, 2019.

LEE, Y. J. et al. Screening wild yeast strains for alcohol fermentation from various fruits. **Mycobiology**, v. 39, n. 1, p. 33–39, 2011.

OSBURN, K.; AHMAD, N. N.; BOCHMAN, M. L. Bio-prospecting, selection, and analysis of wild yeasts for ethanol fermentation. **Zymurgy**, v. 39, p. 81–89, 2016.

SPITAELS, F. et al. The microbial diversity of traditional spontaneously fermented lambic beer. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

STEENSELS, J. et al. Review Domestication of Industrial Microbes. **Current Biology**, v. 29, n. 10, p. R381–R393, 2019.

STEENSELS, J.; VERSTREPEN, K. J. Taming Wild Yeast: Potential of Conventional and Nonconventional Yeasts in Industrial Fermentations. **Annual Review of Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 61–80, 2014.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

CARACTERIZAÇÃO DO ISOLADO ONP131 DE *MONILIELLA MEGACHILIENSIS* PARA PRODUÇÃO DE CERVEJA

RENAN EUGÊNIO ARAUJO PIRAINE[1]; DAVID J. SUN[2]; MATT WISLEY[3]; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE[4]; MATTHEW L. BOCHMAN[5]

Leveduras selvagens com aplicação na produção de cerveja



Moniliella megachiliensis **é capaz de fermentar cerveja?**



Olympic National Park
Port Angeles, WA, US



Isolamento de *M. megachiliensis* das amostras



PCR e análise filogenética



Testes de fermentação



Cultivo celular em diferentes condições



Atenuação 40 – 50%
pH 2.5 – 8.0
Glicose, Maltose, Sacarose
28 - 37 °C
Etanol 2 - 5%
NaCl 0.5 - 5%
α- e β-Ácidos 10 - 200 ppm

A levedura demonstrou potencial e será aplicada na fermentação de cerveja usando diferentes abordagens



SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO 3-INDOLACÉTICO EM DIFERENTES FASES DO CULTIVO DE *Spirulina* sp. LEB 18 PARA AUMENTO DA PRODUTIVIDADE DE BIOMOLÉCULAS

BRUNA ABEL PACKOWSKI[1]; JÉSSICA TEIXEIRA DA SILVEIRA[2]; ANA PRISCILA CENTENO DA ROSA[3]; JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA[4]

[1,2,3,4]Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB); Escola de Química e Alimentos (EQA); Universidade Federal do Rio Grande (FURG) –[1]brunablpk@gmail.com; [2]jessicatsilveira@hotmail.com; [3]ana.centeno@yahoo.com.br; [4]jorgealbertovc@gmail.com.

1. INTRODUÇÃO

Por sua vasta aplicação e potencialidade como produto, (COSTA et al., 2019) *Spirulina* é o gênero microalgal mais estudado no Brasil e a microalga procariótica que abrange mais publicações no mundo (GARRIDO-CARDENAS et al., 2018). Esse microrganismo se destaca em cultivos comerciais, pois sua biomassa e biomoléculas podem ser utilizadas como matérias-primas na produção de rações, pigmentos, fármacos, biocombustíveis, entre outros (ANDRADE; COSTA, 2008). Contudo, com a tendência atual da população de busca por saúde, a indústria de alimentação saudável é uma das que mais busca inovação na utilização de microalgas. Isso porque, essas podem ser utilizadas como ingredientes proteicos alternativos na formulação de alimentos funcionais e suplementos alimentares (PEREIRA et al., 2018).

Devido a isso, várias estratégias visam aumentar a concentração de biomassa e biocompostos dessa microalga. Dentre essas, a pesquisa de SILVEIRA (2019), relatou que suplementar o fitohormônio ácido 3-indolacético (AIA) em cultivos microalgais pode ser uma solução eficiente para melhorar a produção de biomassa, proteínas e lipídios. No entanto, o estudo não apresentou resultados referente à produtividade dos biocompostos.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo aumentar a produtividade de proteínas e lipídios a partir da suplementação de ácido 3-indolacético em diferentes fases do cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18.

2. METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados com a microalga *Spirulina* sp. LEB 18 (MORAIS et al., 2008) em meio Zarrouk (ZARROUK, 1966). Para a suplementação dos cultivos foi utilizado o fitohormônio comercial ácido 3-indolacético - AIA (98 %, Sigma-Aldrich, Brasil).

Os cultivos foram conduzidos em fotobiorreatores do tipo *Erlenmeyer* de 0,5 L (volume útil de 0,4 L) por 30 dias. Os experimentos foram compostos por seis duplicatas com suplementação de 0,1 mg L^{-1} de AIA em cada (SILVEIRA, 2019) em diferentes dias. Esses foram denominados D0, D5, D10, D15, D20 e D25, os quais eram referentes aos dias em que o fitohormônio foi adicionado a cada um – dia 0, 5, 10, 15, 20 e 25, respectivamente. Para efeito de comparação, em uma das duplicatas não foi adicionado AIA (ensaio controle – C).

A concentração celular inicial do experimento foi de 0,2 g L^{-1} e a condução se deu de forma descontínua (C e D0) e batelada alimentada (D5, D10, D15, D20 e D25). Todos os cultivos foram realizados em câmara termostatizada mantida a 30 ºC com fotoperíodo de 12:12 h (claro:escuro) (REICHERT et al., 2006), intensidade luminosa de aproximadamente 70 µmol fótons m^{-2} s^{-1} fornecidos por lâmpadas fluorescentes e agitação por meio de injeção de ar.

Ao final dos experimentos, a biomassa liofilizada foi utilizada para realizar análises de caracterização. Para a quantificação de lipídios se fez o uso do método de MARSH; WEINSTEIN (1966), extraindo as biomoléculas com solventes orgânicos clorofórmio:metanol (1:2) e comparando-as com curva padrão de tripalmitina. Para realizar a determinação de proteínas, os extratos de biomassa foram submetidos a tratamento em sonda ultrassônica a fim de romper a parede celular e liberar material intracelular. A metodologia utilizada para quantificar proteínas foi LOWRY et al. (1951), com pré-tratamento térmico e alcalino, e utilizando albumina de soro bovino como padrão.

A produtividade volumétrica de biomassa foi calculada utilizando as concentrações de biomassa no tempo inicial e final de cultivo. As produtividades das biomoléculas foram determinadas multiplicando os resultados da produtividade de biomassa pela concentração das biomoléculas quantificadas.

As médias foram comparadas a partir de triplicatas por Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95 % ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de produtividade de proteínas foram superiores ao experimento controle em todas as condições testadas (Tabela 1). Por outro lado, a produtividade de lipídios foi aumentada somente em duas das condições testadas (D5 e D10).

Tabela 1 - Produtividade das biomoléculas referentes ao cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 com adição de AIA em diferentes fases do crescimento

Experimento	Produtividade de Proteínas (mg L^{-1} d^{-1})	Produtividade de Lipídios (mg L^{-1} d^{-1})
C	$64,13^{d} \pm 4,36$	$15,10^{b,c} \pm 1,51$
D0	$85,35^{b} \pm 2,83$	$11,61^{d} \pm 1,07$
D5	$93,87^{a} \pm 2,49$	$16,87^{a,b} \pm 1,29$
D10	$80,50^{c} \pm 3,20$	$17,96^{a} \pm 1,74$
D15	$91,27^{a} \pm 1,02$	$15,07^{a,b} \pm 1,37$
D20	$80,81^{b,c} \pm 4,45$	$13,61^{c,d} \pm 1,26$
D25	$82,48^{b,c} \pm 3,77$	$14,64^{b,c} \pm 1,58$

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as respostas ($p \leq 0,05$).

Os melhores resultados para os experimentos com proteínas foram obtidos quando AIA foi adicionado aos cultivos nos dias 5 (94 mg L^{-1} d^{-1}) e 15 (91 mg L^{-1} d^{-1}). Essas condições geraram um incremento na produtividade proteica de 46 % e 42 %, respectivamente, em relação ao cultivo sem a adição do fitohormônio. As proteínas constituem a maior fração da composição da biomassa de *Spirulina*, consequentemente, também é a biomolécula que apresenta maior produtividade. Esse é um fator relevante principalmente para aplicação da biomassa microalgal na indústria alimentícia (FONSECA, 2016).

Na análise lipídica, ao adicionar AIA no 10° dia de experimento, a produtividade teve aumento de 18 % e com suplementação no dia 5, obteve-se incremento de 11% em relação ao controle. Nas demais condições, a suplementação não exerceu a atividade esperada, com resultados inferiores em relação ao ensaio sem suplementação. Essa redução pode estar ligada à concentração de fitohormônio adicionada aos cultivos não ser ideal para estimular a produção de lipídios. No estudo de SILVEIRA (2019) foi relatado que a faixa ideal de concentração de suplementação do fitohormônio AIA para *Spirulina* sp. LEB 18 a fim de estimular a produção lipídica é restrita e concentrações acima da faixa ideal diminuem a produção dessa biomolécula. Acredita-se que esse fator também foi significativo nesse estudo.

4. CONCLUSÕES

A suplementação de AIA em diferentes dias se mostrou uma estratégia promissora para promover o aumento da produtividade de biomoléculas no cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18. Os experimentos com adição do fitohormônio no dia 5 apresentaram resultados positivos para as produtividades analisadas, sendo o aumento de 46 % para proteínas e 11 % para lipídios, em relação ao experimento controle. Esses resultados podem ser de grande valia, principalmente para a indústria de suplementos alimentícios e alimentos funcionais, a qual utilizando ingredientes alternativos de *Spirulina* pode produzir alimentos de forma sustentável para atender à demanda mundial por alimentos mais saudáveis.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC), CNPq e CAPES pelo apoio financeiro e concessão de bolsas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.5, p.1551-1556, 2008.

COSTA, J. A. V.; FREITAS, B. C. B.; ROSA, G. M.; MORAES, L.; MORAIS, M. G.; MITCHELL, B. G. Operational and economic aspects of *Spirulina*-based biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 292, 121946, 2019.

FONSECA, J. A. **Aplicação de algas na indústria alimentar e farmacêutica**. 2016. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa.

GARRIDO-CARDENAS, J. A.; MANZANO-AGUGLIARO, F.; ACIEN-FERNANDEZ, F. G.; MOLINA-GRIMA, E. Microalgae research worldwide. **Algal Research**, v.35, p.50–60, 2018.

LOWRY, O. H.; ROSEBOUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein menasurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265–275, 1951.

MARSH, J. B.; WEINSTEIN, D. B. Simple charring method for determination of lipids. **Journal of Lipid Research**, v.7, p.574–576, 1966.

MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Journal of Biosciences**, v.63, p.144–150, 2008.

PEREIRA, A. M.; LISBOA, C. R.; COSTA, J. A. V. High protein ingredients of microalgal origin: Obtainment and functional properties. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.47, p.187-194, 2018.

REICHERT, C. C.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.23, p.23–28, 2006.

SALLA, A. C. V., MARGARITES, A. C., SEIBEL, F. I., HOLZ, L. C., BRIÃO, V. B., BERTOLIN, T. E., COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina* in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate. **Bioresource Technology**, v.209, p.133–141, 2016.

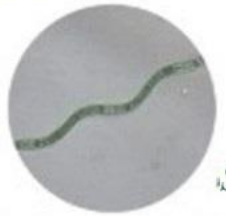
SILVEIRA, J.T. **Cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 suplementado com os fitohomônios ácido 3-indolacético e *trans*-zeatina**. 2019. 111 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une cyanophycée influence de divers facteurs physuques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima***. Ph.D Thesis, Université de Paris, 1966.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

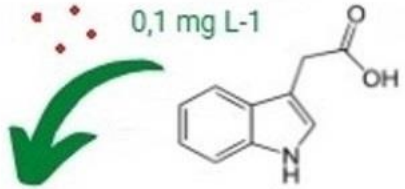
SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO 3-INDOLACÉTICO EM DIFERENTES FASES DO CULTIVO DE *Spirulina* sp. LEB 18 PARA AUMENTO DA PRODUTIVIDADE DE BIOMOLÉCULAS

BRUNA ABEL PACKOWSKI[1]; JÉSSICA TEIXEIRA DA SILVEIRA[2]; ANA PRISCILA CENTENO DA ROSA[2]; JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA[3]

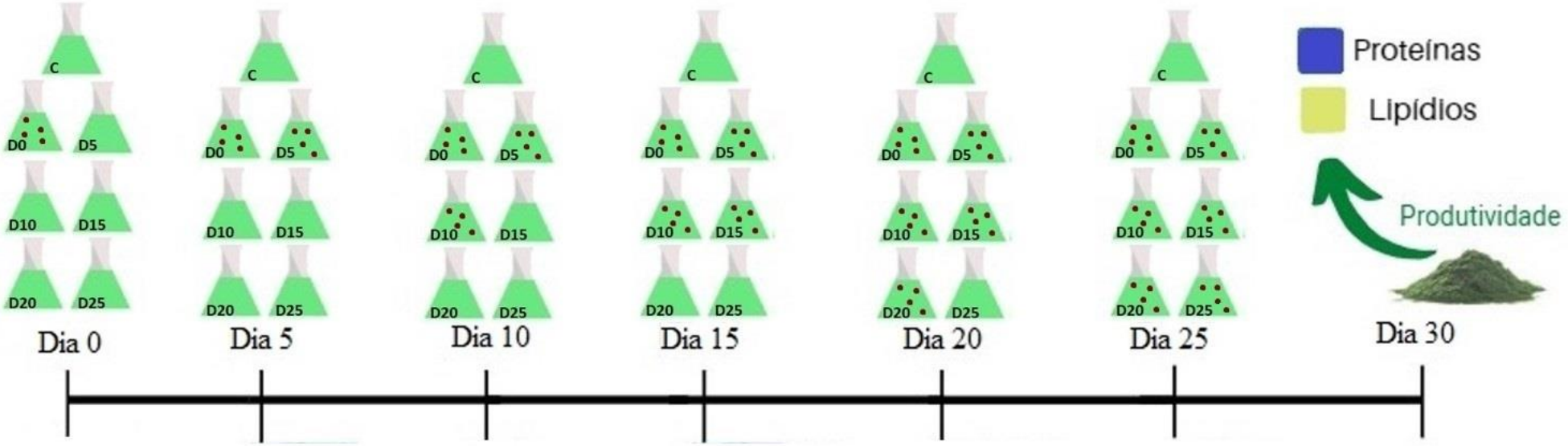


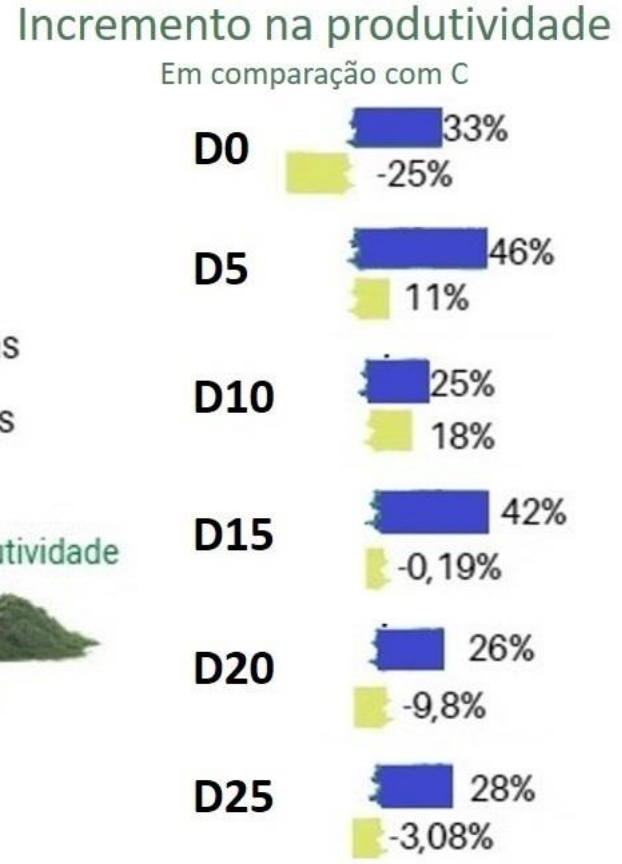
Meio Zarrouk
+
Spirulina sp. LEB 18

0,1 mg L-1



Ácido 3-indolacético
(AIA)





PRODUÇÃO DE O-RINGS POR IMPRESSÃO 3D E TESTES PARA UTILIZAÇÃO NA ENGENHARIA TECIDUAL

BRUNA GOVONI[1]; NATASHA MAURMANN[2]; JOÃO ALVAREZ PEIXOTO[3] PATRÍCIA PRANKE[4]

[1]Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – bruna-govoni@uergs.edu.br
[2]Universidade Federal do Rio Grande do Sul – pesquisa.natasha@gmail.com
[3] Universidade Estadual do Rio Grande do Sul - joao-peixoto@uergs.edu.br
[4]Universidade Federal do Rio Grande do Sul – patriciapranke@ufrgs.br

1. INTRODUÇÃO

A engenharia tecidual objetiva a utilização de biomateriais, bem como o uso de células e fatores de crescimento para a regeneração de tecidos (MAURMANN *et al*, 2017). Para testar a biocompatibilidade do biomaterial, são realizados teste com culturas de células. Com isso, são utilizados "O-*rings*", que são anéis que garantem que os biomateriais se mantenham em contato com as células e não flutuem. Estes O'rings devem ser atóxicos e inertes, para que não venham a interferir nos resultados dos ensaios biológicos. Os O-rings podem ser compostos por diversos materiais, como borracha (HU *et al*, 2020), silicone, aço inox, entre outros. A maioria dos artigos não menciona o uso destes, e os que mencionam, pouco relatam sobre seu material. No Brasil, é restrita a comercialização desses tipos de materiais laboratoriais.

Devido a necessidade de uma geometria específica para confecção do O-ring e uso de um material adequado ao ensaio, surge a proposta de manufatura aditiva, também chamada de impressão 3D (VOLPATO, 2017). Diferentemente da manufatura subtrativa (LWT, 2016) e manufatura conformativa (SCHAEFFER, 2004), a manufatura aditiva age no princípio da deposição de material fundido - FDM (*Fused Deposition Modeling*), onde o material é adicionado, camada por camada, até que as formas do objeto sejam então materializadas (3DFILA, 2020). Isto permite a utilização de materiais como o ácido poliláctico (PLA), que é um polímero sintético, biocompatível, que não afeta a amostra e com boa disponibilidade no mercado.

O objetivo desta pesquisa foi produzir O-rings de PLA e testá-los de forma experimental em uma cultura de células.

2. METODOLOGIA

Os suportes O-rings de PLA foram impressos em uma impressora 3DCloner, com volume de impressão de 150 mm x 150 mm x 150 mm, temperatura de fusão de até 220°C e filamento fundido com diâmetro de 0,2 mm, gerando camadas nesta espessura. A modelagem foi realizada pelo *software* FreeCAD (FREECAD, 2020), gerando os arquivos com extensão STL (*Standard Triangle Language*), responsável por transformar o sólido 3D em um polígono multifacetado, resultando em uma superfície geométrica em 3 dimensões. Cada

O-ring foi impresso com o diâmetro externo de 15,2 mm e interno de 12 mm, sendo altura de 3 mm, e lixados manualmente para evitar aderência.

Os O-rings de PLA impressos e de silicone comercializados para vedação foram esterilizados em autoclave, 1 atm por 30 minutos. Também foi comparada a esterilização química com 25% de glutaraldeído por 7 horas e 30 minutos, com posterior lavagem duas vezes com tampão fosfato-salino (PBS).

Sob condições estéreis, os O-rings foram colocados em placas de culturas de 24 poços, sendo 3 poços com o uso do material de silicone, 3 poços com o material de PLA, e 3 poços controle, isto é, sem o uso de O-ring.

Foram cultivadas 10.000 queratinócitos (linhagem de células HaCat), com meio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) com alta glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de estreptomicina e penicilina.

Após 5 dias de cultivo foram feitas microfotografias para acompanhamento do crescimento das células. Após de 6 dias foi realizado o teste de viabilidade das células por meio do ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (MTT) segundo MAURMANN e colaboradores (2017). A solução de MTT (0,25mg/mL) foi mantida por 4 horas de incubação a 37°C e os cristais de formazan formados foram dissolvidos com dimetil sulfóxido (DMSO). A leitura foi realizada em espectrofotômetro MultiskanTM FC (Thermo Scientific – Thermo Fisher Scientific®) e o resultado calculado pela diferença de absorbâncias nos comprimentos de onda de 630 e 570nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os O-rings impressos em manufatura aditiva apresentaram suas superfícies lisas e uniformes. A maioria dos O-rings encaixou nos poços das placas de cultura; entretanto alguns ficaram apertados e outros frouxos.

O comportamento celular nos diferentes grupos experimentais após cinco dias de cultivo é demonstrado na Figura 1. Quando a esterilização térmica foi utilizada, observou-se maior número de células nos poços onde foram adicionados os O-rings impressos de PLA, em comparação com os O-rings comerciais de silicone. Além disso, é possível observar menor número de células nos poços quando as mesmas foram cultivadas em contato com os O-rings, submetidos a esterilização com glutaraldeído.

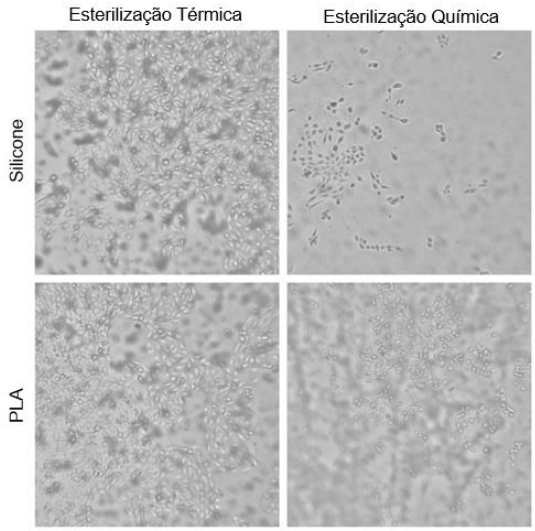


Figura 1- Microfotografias das células nos diferentes grupos experimentais após 5 dias de cultura. Imagens representativas mostrando as células HaCat

Os resultados do ensaio de atividade mitocondrial (MTT), que correlaciona a quantidade de células viáveis, estão demonstrados na Figura 2. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os poços controle e os poços com o O-ring impresso, indicando que a viabilidade das células nos poços com esse material foi similar aos poços sem materiais ($p>0,05$). Por outro lado, com a utilização de O-rings de silicone utilizados comercialmente para vedação, houve diminuição da viabilidade celular em comparação com o controle ($p<0,01$). A comparação entre os O-rings impressos e os comerciais também demonstrou diferença na viabilidade ($p < 0,05$).

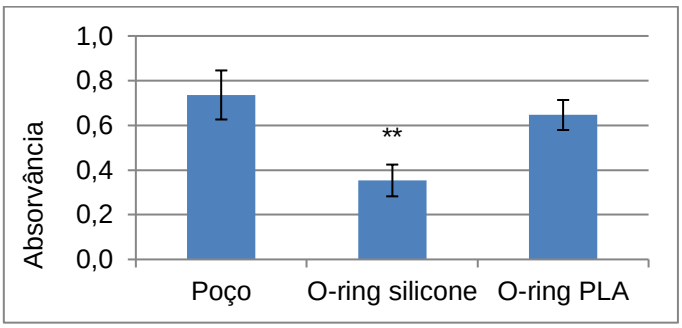


Figura 2- Resultado do cultivo de HaCat no teste dos O-rings após 6 dias. Os dados estão expressos como média da absorbância ± desvio padrão por meio do teste MTT. Grupo Poço (controle - placa de cultivo), Grupo O-ring silicone (células cultivadas na presença do O-ring de silicone) e Grupo O-ring PLA (células cultivadas na presença do O-ring 3D impresso). ** indicam $p < 0.0101$ por ANOVA seguida por Tukey.

Já os resultados de MTT após a esterilização com glutaraldeído não indicaram a presença de células viáveis. Os valores de média da absorbância ±

desvio padrão dos poços controle (sem os O-rings) foi 0,736 ± 0,110 e os valores nos poços O-ring após a esterilização química foram 0,028 ± 0,002 ($p < 0.01$) para os materiais de silicone e 0,039 ± 0,011 ($p < 0.01$) no caso dos materiais de PLA. Esses resultados indicam que as lavagens dos O-rings com solução tampão não foram efetivas para a remoção do glutaraldeído utilizado na esterilização.

4. CONCLUSÕES

Com o presente estudo pode-se concluir que o O-ring de PLA, obtido por manufatura aditiva, não foi citotóxico, garantindo sua aplicabilidade quando gerados a partir de impressão 3D, com a funcionalidade de ter sua geometria facilmente ajustada para o suporte de ensaio. Para que os O-ring sejam mais eficazes, será testado o PLA flexível.

Em relação ao método de esterilização, embora o glutaraldeído seja utilizado neste tipo de ensaio, pode ter ficado resíduos mesmo com duas lavagens, o que poderia ter sido minimizado com um número maior de lavagens. Já a utilização de autoclave para a esterilização dos O-rings não causou toxicidade às células.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

3DFILA. **Conheça as etapas da impressão 3D FDM ou FFF**. 2018. Disponível em: https://3dfila.com.br/conheca-as-etapas-da-impressao-3d-fdm-ou-fff/. Acesso em: 22 jun. 2020.

FREECAD. **FreeCAD:** Your own 3D parametric modeler. Disponível em: https://www.freecadweb.org. Acesso em 12 jun. 2020.

HU, R. *et al*. Facile Chemical Analysis of Live Cell Activities by Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy in the Transmission Mode. **Vibrational Spectroscopy**, [S.L.], v. 109, p. 103068, 2020.

LWT. **Qual a diferença entre as manufaturas aditiva e subtrativas?** 2016. Disponível em: https://www.lwtsistemas.com.br/manufaturas-aditiva-e-subtrativa/. Acesso em: 21 mar. 2019.

MAURMANN, N. *et al.* Mesenchymal stem cells cultivated on scaffolds formed by 3D printed PCL matrices, coated with PLGA electrospun nanofibers for use in tissue engineering. **Biomedical Physics & Engineering Express** v. 3, n. 4, p. 1-15, 2017.

SCHAEFFER, Lírio. **Conformação Mecânica**. [s./l.]: Imprensa Livre, 2004, 168p.

VOLPATO, Neri. **Manufatura Aditiva**: Tecnologias e aplicações da impressão 3D. 1.ed. São Paulo: Blucher, 2017, 400p.

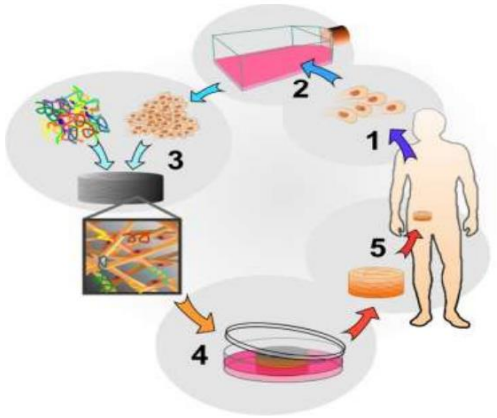
Graduação

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

PPGB Programa de Pós Graduação em Biotecnologia

PRODUÇÃO DE O-RINGS POR IMPRESSÃO 3D E TESTES PARA UTILIZAÇÃO NA ENGENHARIA TECIDUAL

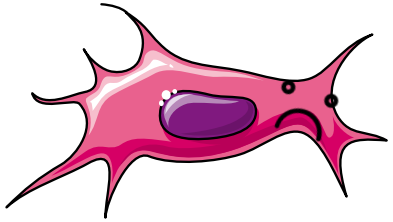
BRUNA GOVONI[1]; NATASHA MAURMANN[2]; JOÃO ALVAREZ PEIXOTO[3]; PATRÍCIA PRANKE[3]



Engenharia de Tecidos



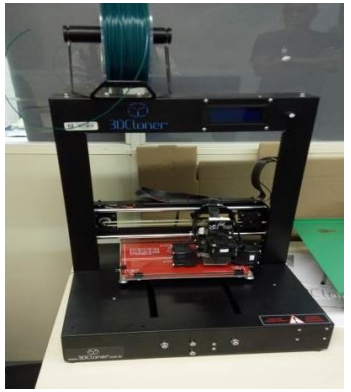
O'ring Silicone



Diminuição da viabilidade celular



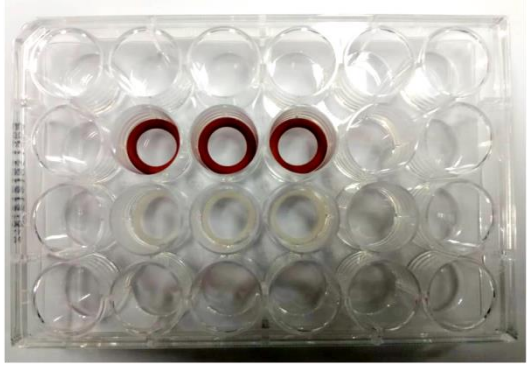
PLA



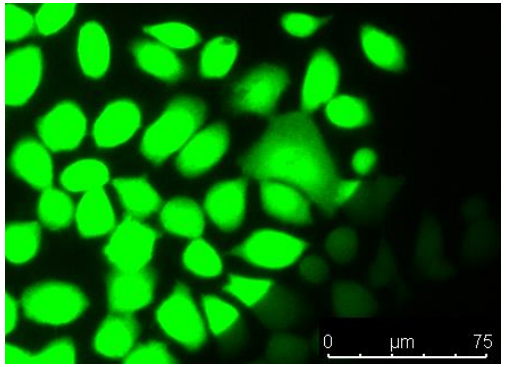
Impressora 3D CLONER



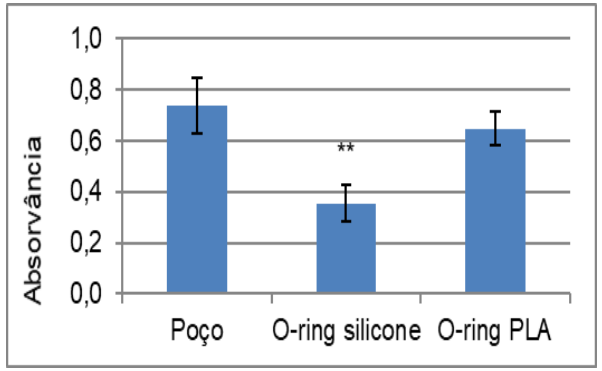
O'ring de PLA



Placa com O'rings para teste



Queratinócitos (HaCat)



Resultado da viabilidade (MTT)

IDENTIDADE E PERTENCIMENTO QUALIFICANDO A FORMAÇÃO DO BIOTECNOLOGISTA: ATIVIDADE SEMINÁRIOS INTEGRADORES

RODRIGUES, BRUNA MIRANDA [1]; LEON, PRISCILA MARQUES MOURA DE[2];

[1] *Biotecnologia / CDTec - UFPel – bmirandarodrigues@gmail.com*
[2] *Biotecnologia / CDTec – UFPel – primleon@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

A universidade deve proporcionar ao estudante oportunidades de conhecimento além da sala de aula, fazendo com que sua formação seja a mais completa possível. Sendo assim, projetos de ensino são um dos meios de obter esse êxito, pois beneficiam a integração de conteúdos de forma interdisciplinar, favorecem o entendimento de sua aplicação, trazendo a transposição de informações que serão absorvidas com maior facilidade e buscando em sua essência, auxiliar na formação de um biotecnologista de excelência através da aprendizagem sólida e efetiva.

A Biotecnologia compreende um amplo espectro de técnicas e conhecimentos biológicos, que aliados ao uso de organismos vivos permite solucionar problemas ou produzir bens de serviço. Onde é promovida a intersecção de diversas áreas do conhecimento, sendo uma ciência de grande potencial agregado, que para seu desenvolvimento, necessita de um ambiente com forte base acadêmica e científica.

A partir disso, o projeto de ensino “Identidade e pertencimento qualificando a formação do biotecnologista” surge a fim de promover o pertencimento ao curso de Graduação em Biotecnologia (G-Biotec) do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), consolidando a construção de um perfil profissional com qualificação científica e técnica, e ainda, socialmente comprometido.

Buscando garantir qualidade de ensino e formação sólida dos graduandos, é promovido no projeto supracitado uma atividade denominada “Seminários Integradores”. Esta atividade de ensino promove a reflexão de temas de aplicação da Biotecnologia pelos alunos graduandos dos diferentes semestres do curso, junto aos mediadores e especialistas no assunto, de forma a integrar os conteúdos vistos nos diferentes semestres em um assunto de aplicação e de impacto atual da biotecnologia. Com isso, o objetivo deste trabalho é relatar a forma de planejamento, organização e realização dos Seminários Integradores da Biotecnologia, avaliando a opinião dos participantes frente a esta atividade extraclasse e o impacto na sua formação acadêmica.

2. METODOLOGIA

A atividade dos Seminários Integradores da Biotecnologia tiveram início no ano de 2019, quando foram realizadas três edições no curso de Graduação em Biotecnologia. Para a execução desses encontros, em reuniões sistemáticas foram discutidas e elencadas as práticas didáticas que seriam utilizadas na atividade de ensino. Os temas pertinentes de aplicação da Biotecnologia e com caráter integrador foram escolhidos. Além disso, foi elaborado um edital e um formulário para inscrição dos alunos interessados. Os mediadores especialistas nos assuntos escolhidos foram convidados e foi feita a escolha do material enviado aos participantes como suporte. O dia e horário do encontro foi determinado e publicado através de e-mail e redes sociais da atividade, sendo estes o Facebook, Instagram e grupo do Whatsapp.

A fim de avaliar a metodologia adotada nesta atividade de ensino, e também de arrecadar sugestões para os encontros subsequentes, ao final de cada encontro foi entregue aos participantes e colaboradores um formulário específico para avaliação. Após as respostas foram contabilizadas e analisadas pela equipe organizadora.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os Seminários Integradores da Biotecnologia promoveram a interação entre alunos de diferentes semestres da graduação com profissionais/pesquisadores atuantes nas áreas de interesse abordadas nas diferentes edições da atividade. Isto acabou favorecendo um fluxo de troca de informações, gerou conhecimento, promoveu o sentimento de identidade com a profissão e o pertencimento ao curso.

Como prática didática, foi determinado que o seminário aconteceria a partir da discussão promovida pelo um trio de mediadores/colaboradores especialista e atuantes na temática foco, além, da intercessão promovida pela coordenadora do projeto e pela bolsista de ensino. Foi determinado que ao longo de cada atividade seria construído um mapa conceitual embasado no que foi abordado na reflexão promovida.

As temáticas abordadas foram escolhidas em conjunto entre os estudantes participantes e os organizadores. O primeiro assunto eleito foi “CRISPR”, que significa “Conjunto de Repetições Palindrômicas Curtas Regularmente Espaçadas“, ao qual se transformou em uma importante ferramenta da engenharia genética; e tem sido apontada como um grande marco na evolução da biotecnologia moderna. O segundo encontro foi acerca do tema “Vacinas”, que são produtos em constante evolução pelo avanço da biotecnologia, que no entanto, tem sofrido pelo impacto negativo na população através da propagação de falsas notícias. E o terceiro tema escolhido foi sobre “Bactérias Multirresistentes”, tratando acerca das principais

causas de sua evolução, uso indiscriminado de antibióticos e as soluções que a Biotecnologia tem desenvolvido neste âmbito.

Os encontros aconteceram na sala do Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia (PPGB), no prédio 20 do Campus Capão do Leão da UFPel, das 12:30 até 14 horas. Os participantes realizaram a inscrição através de um formulário do Google Docs fornecido pela comissão organizadora. Foram inscritos 26 alunos, provenientes dos diferentes semestres em andamento do curso. Foram utilizadas redes sociais e aplicativos para divulgar as datas e horários, assim como divulgar o tema e conteúdos selecionados como base teórica. A cada encontro foi estabelecido um cronograma de discussão a fim de organizar o conteúdo, ampliar a discussão e aprofundar os conhecimentos sobre o assunto previamente determinado. Os alunos, participaram ouvindo, discutindo, perguntando e interagindo com os mediadores.

O grande diferencial dos Seminários Integradores são os mapas conceituais que foram construídos durante os encontros. Estes, são realizados com o intuito de servir de resumo da discussão, e permanecer como um material de estudo sobre os assuntos abordados nos encontros.

Através dos formulários de avaliação pode-se perceber que os encontros mostraram-se satisfatórios, alcançando nota 10 em escolha do tema e relevância para biotecnologistas. Foi analisado também que a abordagem didática dos temas estava sendo conduzida de forma clara e eficiente, pois foi obtida a média 9 neste quesito de avaliação entre os participantes.

Foram sugestões propostas para temáticas dos próximos encontros: produção de antibióticos; soluções para diminuir a quantidade de plásticos em oceanos; neurologia biotecnológica; modelos animais; transgênicos; e xenotransplante.

A partir das atividades propostas com os Seminários Integradores, obtivemos relatos extremamente satisfatórios por parte de seus participantes, o que ilustra a qualificação acadêmica promovida como resultado efetivo deste projeto de ensino do curso de Graduação em Biotecnologia.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que a proposta da atividade dos “Seminários Integradores da Biotecnologia” alcançou o intuito de fomentar o conhecimento científico e aumentar as vivências entre os estudantes de todas as etapas do curso através de uma visão inter e multidisciplinar. As discussões buscaram fomentar a reflexão aprofundada sobre a atuação do biotecnologista, abordando questões técnicas, marcando o papel do profissional na sociedade e discutindo a ética envolvida na aplicação das biotécnicas. As atividades foram retomadas de forma remota neste semestre alternativo do calendário acadêmico da UFPel, permitindo seguimento do projeto e novas perspectivas de ação pedagógica.

5. REFERÊNCIAS

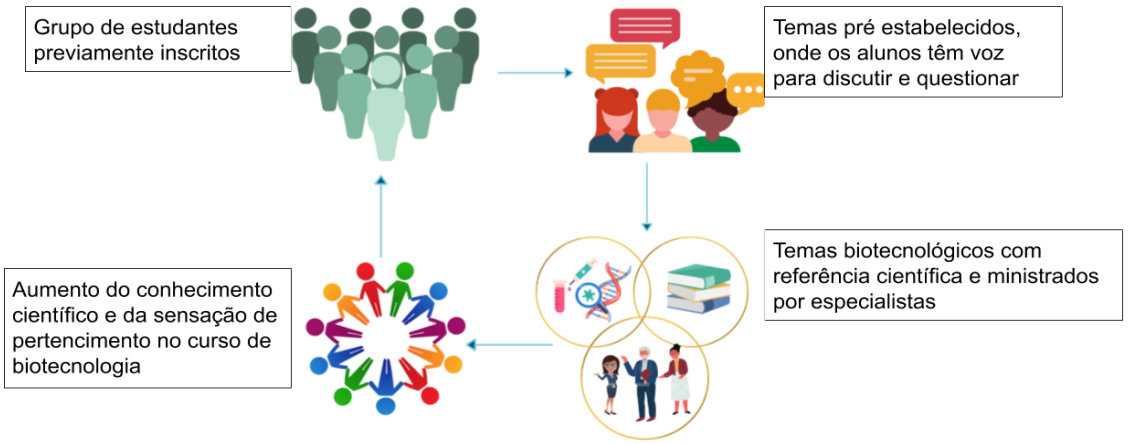
BSTIELER, L.; HEMMERT, M.; BARCZAK, G. Trust Formation in University–Industry Collaborations in the U.S. Biotechnology Industry: IP Policies, Shared Governance, and Champions. Product Innovation Management, vol. 32, p.11-121, 2014.

MOITA, F. M. G. S. & ANDRADE, F. C. B. Ensino-pesquisa-extensão: um exercício de indissociabilidade na pós graduação. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/rbedu/v14n41/v14n41a06.pdf MUGNANI, R.; POBLACION, D. A. M. A. Multidisciplinaridade e especificidade na comunicação científica: discussão do impacto na avaliação de diferentes áreas. RECIIS – R. Eletr. de Com. Inf. Inov. Saúde, v.4, n.5, p.23-30, 2010.

PRADO, M. Pedagogia de Projetos. Série "Pedagogia de Projetos e Integração de Mídias" - Programa Salto para o Futuro, Setembro, 2003.

SILVEIRA, J; POZ, ME Dal; FONSECA, MG; BORGES, IC. Evolução recente da biotecnologia no Brasil. Campinas, SP: Instituto de Economia. Universidade Estadual de Campinas, 2004.

POWELL, W. W; KOPUT, Kenneth W; DOERR, Laurel Smith. Interorganizational Collaboration and the Locus of Innovation: Networks of Learning in Biotechnology. Administrative Science Quarterly, vol. 41, No. 1, p. 116-145, 1996.



FITOQUÍMICOS VEGETAIS COM POTENCIAL ANTI-SARS-COV-2

EDMILSON CAETANO JUNIOR[1]; SARA DA SILVA KHALIL[2]; OMAR ARAFAT KDUDSI KHALIL[3]

[1]Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná (IFPR) Campus Londrina – juniorcaetano09@hotmail.com
[2] Universidade de Brasília, – dasilva.saraa@gmail.com
[3]IFPR Campus Londrina – gauarabe@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A COVID-19, doença causada pelo SARS-CoV-2, tem causado impacto sem precedentes na história das infecções virais humanas. Até o dia 03 de agosto de 2020 – cerca de nove meses após seu surgimento, a Organização Mundial da Saúde apontou 21.260.760 casos confirmados em 213 países, com uma taxa superior a 3,5% de mortes (WHO, 2020).

Não há tratamento farmacológico disponível para tratar a COVID-19 até o momento. Dada a gravidade desta doença, é urgente a necessidade de se encontrar opções terapêuticas em apoio aos protocolos existentes para auxiliar na prevenção, tratamento, controle da sintomatologia e diminuir a gravidade das infecções causadas pelo SARS-CoV-2 (FUZIMOTO; ISIDORO, 2020).

Pesquisas com o SARS-CoV e o MERS-CoV, responsáveis pelos primeiros surtos de coronavírus deste século, forneceram dados sobre fitoquímicos antivirais, apontando que estes são fonte de compostos ativos que podem ser usados contra coronavírus (CHOJNACKA *et al.*, 2020).

Assim, o objetivo deste estudo foi realizar uma revisão de literatura sobre o uso de fitoquímicos como recursos antivirais potenciais frente à COVID-19.

2. METODOLOGIA

As questões da pesquisa foram formuladas sobre aspectos relacionados à COVID-19 e fitoquímicos utilizados em seu tratamento ou com pesquisa em andamento. As bases eletrônicas consultadas foram o SCIELO e ScienceDirect. Foram utilizadas as palavras-chave: “Covid-19”, “*plant*”, “*antiviral activity*” e “*phytochemical*”, com o auxílio dos operados booleanos “*and*” e “*or*”, combinados. O período de abrangência foi de janeiro a agosto de 2020. Foi criada uma lista de artigos obtidos incluídos no estudo, destacando-se seis trabalhos. Os principais critérios de inclusão foram: artigos de pesquisa, editoriais, notas curtas, estudos de caso e revisões em periódicos que façam divulgação nas áreas médicas e ciências básicas e que tratassem sobre o uso de moléculas vegetais com ação antiviral frente ao SARS-CoV-2. Também foram incluídas publicações de instituições governamentais ou de pesquisa renomadas, como a World Health Organization (WHO).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Até o momento, nenhuma vacina ou tratamento antiviral específico está disponível para o tratamento de COVID-19. A interação molecular entre os receptores das células virais e as células hospedeiras, principalmente com glicoproteínas de superfície, é particularmente importante para o desenvolvimento de um tratamento antiviral (SHARMA *et al.*, 2020), porém outras estruturas ou moléculas virais também tem sido pesquisadas.

GURUNG *et al.* (2020) realizaram análise *in silico* para propor moléculas protótipo como potenciais inibidores da enzima protease tipo C de coronavírus. Do repertório de fitoquímicos consultados na base de dados da *Food na Drug Administration* que podem ser utilizados para o tratamento da infecção por coronavírus em humanos, os autores apontaram a molécula 102.004.710 (18-hidroxi-3-epi-α-ioimbina) como potencial inibidor de protease tipo C do SARS-CoV-2 e do SARS-CoV e 11.646.359 (*Vincapusine*), 120.716 (Aloioimbina) e 10.308.017 (*Gummadiol*) como potenciais inibidores de SARS-CoV-2, SARS-CoV e MERS-CoV. Como a bioatividade desses compostos contra infecções virais não foi relatada até o momento, estes são fitoquímicos possuem potencial como protótipos a ser explorados contra infecções por coronavírus em humanos.

RUSSO *et al.* (2020), propõem o desenvolvimento de protocolos terapêuticos baseados em anti-inflamatórios e antivirais naturais já conhecidos como opção terapêutica, preventiva alternativa ou adicional, uma vez que estudos *in silico* e *in vitro* demonstraram que fitoativos polifenólicos de baixa massa molecular podem interferir em vários estágios do ciclo de replicação de coronavírus. Entre estes, citam-se flavonoides bastante conhecidos, como a quercetina, baicalina, luteolina, hesperetina, galocatequina e galato de epigalocatequina e alguns mais incomuns, como a escutelareína, amentoflavona e o papiriflavonol A. Estas moléculas podem representar compostos-alvo a serem testados em futuros ensaios clínicos para ampliar o arsenal de medicamentos contra infecções por coronavírus, uma vez que possuem vantagens como suas baixas e conhecidas toxicidades, bem como grande diversidade de atividades biológicas, podendo agir em vários sintomas relacionados a infecção pelo SARS-CoV-2.

CHEN *et al.* (2020) analisaram as propriedades, mecanismos e aplicações antivirais de polissacarídeos e derivados como nova abordagem ao desenvolvimento de medicamentos e vacinas para o tratamento de infecções causadas por coronavírus, especialmente para o COVID-19, e verificaram que glicosaminoglicanos, polissacarídeos marinhos (como carragenina e quitosana) e polissacarídeos da medicina tradicional chinesa (como polissacarídeos de Astragalus sp. e de *Lentinan edodes* e seus derivados) apresentaram potente atividade anti-coronavírus com múltiplos mecanismos, como: (1) interferência na afinidade entre o SARS-CoV-2 e proteoglicanas de heparam sulfatos da superfície da célula hospedeira ou via receptor do fator de crescimento epidérmico, (2) alteração estrutural da proteína no domínio de ligação ao receptor viral (RBD), (3) inibição da transcrição e replicação viral e (4) melhora da resposta imune à vacinação contra SARS-CoV-2.

KALININA *et al.* (2020) analisaram a ação do Panavir®, um produto comercial cujo princípio ativo é a fração de alta massa molecular dos polissacarídeos extraídos de brotos de *Solanum tuberosum* (batata) em 12 pacientes de 22 a 56 anos com a forma grave da COVID-19. O esquema de tratamento incluiu: (1) cinco injeções intravenosas de Panavir® (5 mL de solução a 0,004%), três com intervalo de 24 horas e depois outras duas com intervalo de 48 horas; (2) azitromicina, 500 mg duas vezes ao dia, durante três dias após as três primeiras injeções de Panavir®, depois 500 mg uma vez ao dia por mais três dias. Todos os pacientes apresentaram recuperação completa em até 10 dias após a primeira administração da fração do produto.

4. CONCLUSÕES

As novas tendências em biotecnologia e medicina permitiram o uso de compostos de origem natural em maior extensão do que nas décadas anteriores, principalmente como suplementos alimentares e nutracêuticos (CHOJNACKA *et al.*, 2020), porém, recursos naturais como plantas e derivados com ações antivirais demonstram ser candidatos promissores para a triagem como moléculas protótipo no desenvolvimento de medicamentos para o tratamento de COVID-19. Esses recursos já existentes economizarão tempo e terão bom custo-efetividade no atual cenário de emergência internacional de saúde e na falta de modalidades de tratamento desta doença (SHARMA *et al.*, 2020).

Diversas classes de fitoativos do metabolismo secundário vegetal, como flavonoides e alcaloides, tem demonstrado potencial para uso contra o SARS-CoV-2. Citam-se também polissacarídeos oriundos do metabolismo primário, com ação direta ou indireta (imunoestimulante) no vírus.

Fitoativos com ações antivirais reconhecidas e com baixa toxicidade podem ser considerados como potenciais adjuvantes terapêuticos para o tratamento da COVID-19, em especial na ausência de tratamentos a esta doença ou à sua prevenção.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHEN, X.; HAN, W.; WANG, G.; ZHAO, X. Application prospect of polysaccharides in the development of anti-novel coronavirus drugs and vaccines. International **Journal Of Biological Macromolecules**, China, v.164, p.331-343, 2020.

CHOJNACKA, K.; WITEK-KROWIAK, A.; SKRZYPCZAK, D.; MIKULA, K.; MŁYNARZ, P. Phytochemicals containing biologically active polyphenols as an effective agent against Covid-19-inducing coronavirus. **Journal Of Functional Foods**, p. 104146, 2020.

FUZIMOTO, A.D.; ISIDORO, C. The antiviral and coronavirus-host protein pathways inhibiting properties of herbs and natural compounds - Additional weapons in the fight against the COVID-19 pandemic? **Journal Of Traditional And Complementary Medicine**, EUA/Brasil v. 10, n.4, p.405-419, 2020.

GURUNG, A.B.; ALI, M.A.; LEE, J.; FARAH, M.A.; AL-ANAZI, K.M. Structure-based virtual screening of phytochemicals and repurposing of FDA approved antiviral drugs unravels lead molecules as potential inhibitors of coronavirus 3C-like protease enzyme, **Journal of King Saud University – Science**, Arábia Saudita, *in press*. Doi: https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.07.007

KALININA, T.S.; ZLENKO, D.V.; KISELEV, A.V.; LITVIN, A.A.; STOVBUN, S.V. Antiviral activity of the high-molecular-weight plant polysaccharides. **International Journal Of Biological Macromolecules**, Russia, v.161, p.936-938, 2020.

RUSSO, M.; MOCCIA, S.; SPAGNUOLO, C.; TEDESCO, I.; RUSSO, G.L.; Roles of flavonoids against coronavirus infection. **Chemico-Biological Interactions**, Italy p.109211, 2020.

SHARMA, A.; TIWARI, S.; DEB, M.K.; MARTY, J.L. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2): a global pandemic and treatment strategies. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, Austrália, v.56, n.2, p.106054, 2020.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard**. Data last updated: 2020/8/16, 11:38am CEST.

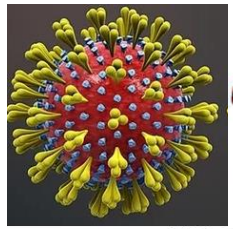
VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

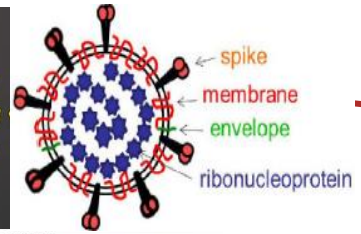
FITOQUÍMICOS VEGETAIS COM POTENCIAL ANTI-SARS-COV-2

EDMILSON CAETANO JÚNIOR[1]; SARA DA SILVA KHALIL[2]; OMAR ARAFAT KDUDSI KHALIL[3]



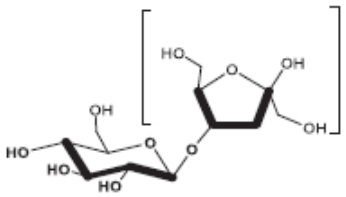
X



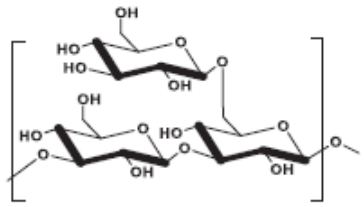


SARS-CoV-2

RL



Astragalus polysaccharides



Letinous edodes polysaccharide

Chen et al. (2020)

- ↓ a afinidade entre o SARS-CoV-2 e proteoglicanas ou EGFR.
- Alteração da RBD viral.
- Inibição da transcrição ou replicação viral.
- Melhora na resposta imune à vacinação contra SARS-CoV-2.

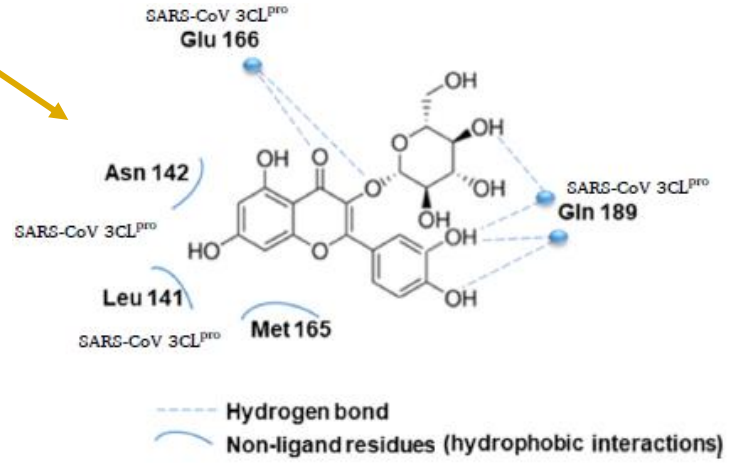
RL



Kalinina et al. (2020)

- Fração de ↑ MM de polissacarídeos de *S. tuberosum*.
- 12 pacientes (22 a 56 anos) com a forma grave da COVID-19.
- Recuperação em até 10 dias.

RL

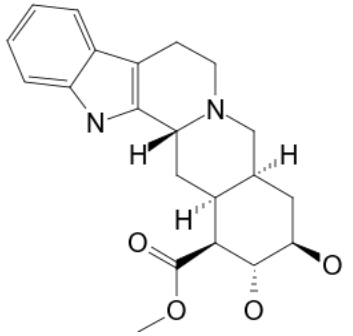


Russo et al. (2020)

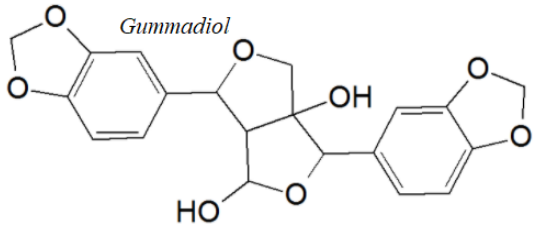
- Ação em etapas de replicação viral.
- ↓ toxicidade.
- ↑ diversidade de ativ. biológicas.

Revisão de Literatura (RL)

18-Hydroxy-3-epi-alphayohimbine



Gummadiol



Gurung et al. (2020)

- Análise *in silico* - (FDA) para protótipos inibidores da protease tipo C de coronavírus.
- potenciais inibidores de SARS-CoV-2, SARS-CoV e MERS-CoV.

AFERÊNCIA DE COMPOSTOS DERIVADOS DA ISONIAZIDA: UMA ANÁLISE DA TOXICIDADE *IN VITRO* E *IN SILICO*

Guilherme Schmitt Rieder[1]; Elton L. Borges[2], Helen A. Goulart[2], Gelson Perinc[2], Paulo H. Schneider[2]; João Batista Teixeira da Rocha[3]

[1]*Universidade Federal de Santa Maria – gschmittrieder@gmail.com*
[2]*Fundação Universidade Federal de Rondônia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Universidade Federal de Pelotas*
[3]*Universidade Federal de Santa Maria – jbtrocha@yahoo.com.br*

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma das principais causas de morbidade e morte infantil, sendo considerado um problema de saúde global, a infecção é causada por *Mycobacterium tuberculosis* e geralmente resulta em doença respiratória aguda e crônica (ZUNZA M et al. 2017).

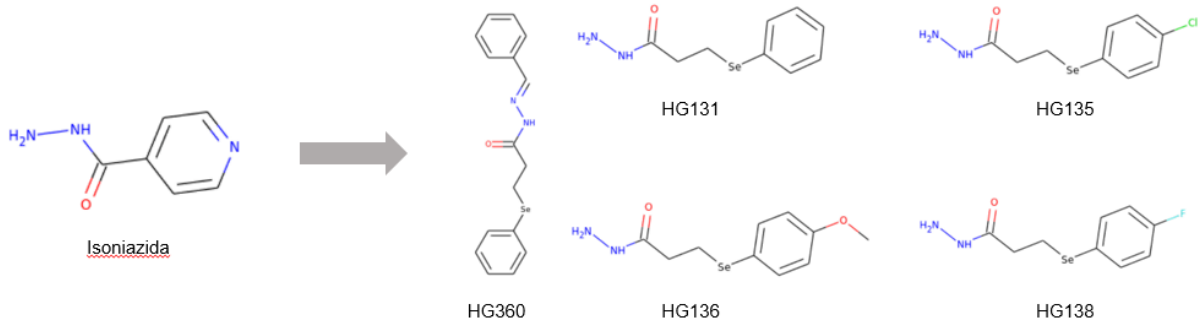
A isoniazida é um dos principais medicamentos utilizados no tratamento da tuberculose, embora dados de melhora dos pacientes após ingerir durante nove meses o fármaco ocorram somente se o indivíduo for totalmente aderente ao tratamento, tornando a taxa real de eficácia do medicamento menor, sem contar com as preocupações em relação ao efeitos colaterais da droga como hepatotoxidade e neuropatia (McCLINTOCK et al. 2017). Com base nessas informações, já se vem utilizando outro medicamento, a rifampicina, juntamente com a isoniazida, justamente para pessoas que não suportam a medicação por nove meses, os resultados da coadministração desses medicamentos vem se mostrado promissores em relação tanto ao resultado de melhora dos pacientes quanto em duração do período de tempo do tratamento (McCLINTOCK et al. 2017).

Sabendo que a isoniazida é o medicamento com maior potencial bactericida e é usado desde o início do tratamento de tuberculose, desde o aparecimento de agentes causadores da tuberculose resistentes a certos medicamentos utilizados para o tratamento, tornou-se imperativo o início da síntese de novos compostos e derivados da isoniazida, buscando a criação de moléculas mais eficazes ao combater a tuberculose ocasionando também a diminuição dos seus efeitos colaterais (PUNKVANG et al.2010).

Portanto, com o intuito de analisar a toxicidade de cinco derivados da isoniazida, o presente trabalho buscou avaliar os compostos *in vitro* e *in silico*, promovendo assim uma triagem dessas moléculas, com o objetivo de selecionar qual delas apresenta propriedades mais tóxicas ou similares a isoniazida.

2. METODOLOGIA

2.1. Estrutura da isoniazida e dos seus derivados:



2.2. Preparação da amostra:

O sangue venoso heparinizado será obtido de voluntários saudáveis doadores do Hospital da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil (30 ± 12 anos). Os eritrócitos serão separados por centrifugação (480 g por 10 min em temperatura ambiente) e o plasma será aspirado. O sedimento celular será lavado três vezes com tampão fosfato-solução salina (6,1 mM e pH 7,4, contendo NaCl 150 mM). O método para separação de leucócitos consistirá em sedimentação diferencial de eritrócitos com dextrana e posteriormente ajustaremos as amostras para 2 x 106 leucócitos / mL com HBSS / heparina.

2.3. Tratamento:

Após o isolamento das células alvos, estas serão expostas a diferentes concentrações dos compostos durante 90 a 180 minutos, a temperatura de 37 graus. Juntamente, será utilizado um grupo controle positivo (veículo dos compostos DMSO, o qual é utilizado em concentração atóxica) e um grupo controle negativo (1 a 2 mM de Terbutil, concentração que cause dano a 50% das células expostas).

2.4. Análises:

2.4.1 Análise da viabilidade celular:

Os procedimentos foram conduzidos seguindo o método de Mischell e Shiingi, 1980. A viabilidade celular será determinada microscopicamente (aumento de 400 ×) e calculada como: o número de células intactas (isto é, aquelas não coradas com azul de tripan) divididas pelo número total de células e multiplicadas por 100 para expressão em porcentagem de células viáveis.

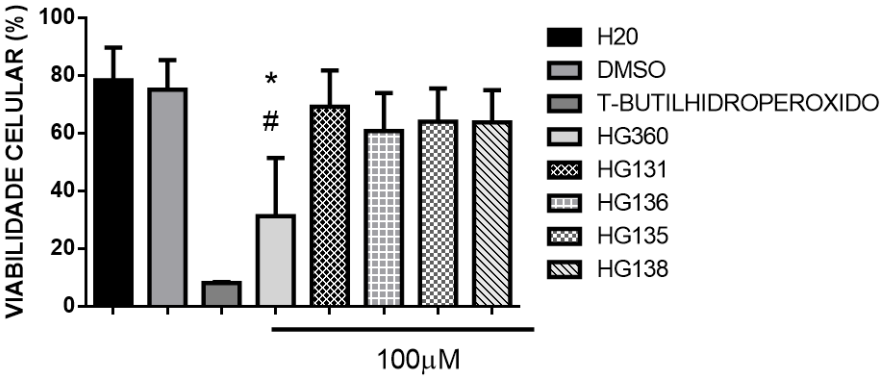
2.4.2 Análise da toxicidade in silico:

O servidor pkCSM foi utilizado para a determinação das propriedades toxicológicas dos compostos derivados da isoniazida (PIRES et al. 2015).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise da viabilidade celular:
A análise da viabilidade celular dos leucócitos é mostrada na figura 1, os testes estatísticos revelaram um efeito redutor na viabilidade celular promovido pelo derivado HG360 após 3 horas de exposição quando comparado aos grupos com água e com o controle positivo.

Figura 1: Viabilidade celular, onde os leucócitos foram expostos durante 3 horas a uma concentração de 100µM de cada composto, os dados foram expressos como média ± EPM, e analisados por ANOVA de uma via seguido pelo teste de múltiplas comparações de tukey´s. * indica diferença significativa dos grupos quando comparados ao grupo com água destilada ($p \leq 0,0001$) e # indica uma diferença significativa dos grupos quando comparados ao grupo DMSO($p \leq 0,001$).



3.2. Análise da toxicidade in silico:
A análise dos valores das propriedades de toxicidade do servidor pkCSM correlacionados com a viabilidade celular é mostrado na figura 2, os testes estatísticos revelaram uma correlação significativa positiva entre os valores da viabilidade celular com os resultados encontrados para as propriedades de máxima dose tolerada em humanos e a toxicidade em peixes. Também foi significativo, mas com valores menos expressivos para as doses de toxicidade aguda e crônica em ratos. Assim, proporcionando uma facilidade na triagem desses compostos, onde o derivado HG360 tinha se mostrado o único tóxico na viabilidade celular enquanto os outros mostraram uma semelhança com os grupos controle, ao descobrirmos que existe uma forte correlação entre a máxima dose tolerada em humanos com a viabilidade celular, podemos induzir que esse derivado causará uma toxicidade alta em humanos até mesmo em concentrações inferiores que os outros derivados.

Figura 2: Análise de correlação entre a viabilidade celular dos compostos derivados com as suas propriedades toxicológicas do servidor pkCSM, os dados foram expressos como média ± EPM, e analisados a partir de uma correlação paramétrica seguidos pelo teste de Pearson r, onde valores com

p<0.05 são considerados significativos e valores de r próximos a 1 representam uma correlação positiva, enquanto próximo a -1, uma correlação negativa.

Propriedades Toxicológicas (pkCSM)	Viabilidade Celular (Valor de r)
Máxima dose tolerada (humana)	0.7065 (p<0.0001)
Toxicidade em peixes	0.7066 (p<0.0001)
Toxicidade aguda em ratos por via oral (LD50)	-0.5798 (p=0.0024)
Toxicidade crônica em ratos por via oral (LOAEL)	0.4489 (p=0.0244)

4. CONCLUSÕES

Portanto, este estudo promoveu uma análise inicial de toxicidade de derivados da isoniazida, com o intuito de facilitar a triagem desses compostos em testes futuros para verificar se um desses derivados tem potencial para ser um composto com efeitos similares a isoniazida, porém sem seus efeitos colaterais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ZUNZA, M.; GRAY, D.M.; YOUNG, T.; COTTON, M.; ZAR, H.J. Isoniazid for preventing tuberculosis in HIV-infected children (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews,** V.8, p.1-37, 2017.

MCCLINTOCK, A.H.; EASTMENT, M.; MCKINNEY, C.M.; PITNEY, C.L.; NARITA, M.; PARK. D.R.; DHANIREDDY, S.; MOLNAR A. Treatment completion for latent tuberculosis infection: a retrospective cohort study comparing 9 months of isoniazid, 4 months of rifampin and 3 months of isoniazid and rifapentine. **BMC Infectious Diseases,** Estados Unidos da América, v.146, n.17, p. 1-8, 2017.

PUNKVANG, A.; SAPARPAKORN, P.; HANNONGBUA, S.; WOLSCHANN, P.; PUNGPO, P. Elucidating Drug-Enzyme Interactions and Their Structural Basis for Improving the Affinity and Potency of Isoniazid and Its Derivatives Based on Computer Modeling Approaches. **Molecules,** Tailândia, v.15, p. 2791-2813, 2010.

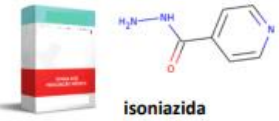
MISCHELL B.B., SHIINGI S.M., Selected Methods in Cellular Immunology, **W.H. Freeman Company**, New York,1–469, 1980.

PIRES, D.E.V.; BLUNDELL, T.L.; ASCHER. D.B. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic properties using graph-based signatures. **Journal of Medicinal Chemistry**, Reino Unido, v.58, n.9, p. 4066–4072, 2015.

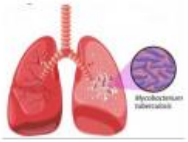
VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

AFERÊNCIA DE COMPOSTOS DERIVADOS DA ISONIAZIDA: UMA ANÁLISE DA TOXICIDADE *IN VITRO* E *IN SILICO*

Guilherme Schmitt Rieder[1]; Elton L. Borges-[2]; Helen A. Goulart [2]; Gelson Perinc [2]; Paulo H. Schneider [2]; João Batista Teixeira da Rocha[3]



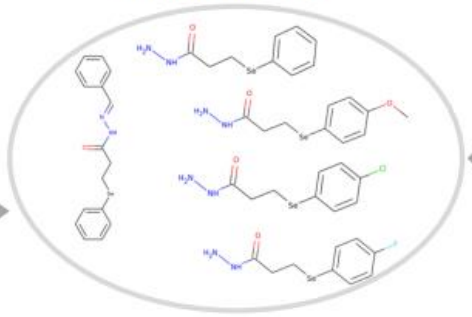
isoniazida

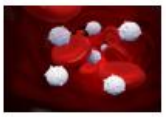




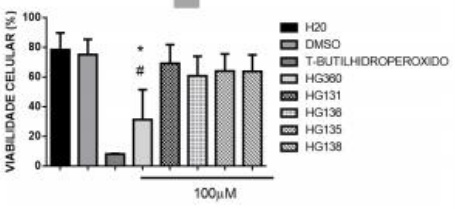
In silico

Derivados da isoniazida





Leucócitos
In vitro



CONSUMO DE IOGURTE E INFLUÊNCIA DE COMPRA: UM ESTUDO DE MERCADO

LAURA DE VASCONCELOS COSTA[1], ÉLDER PACHECO DA CRUZ[2], ELIZANGELA GONÇALVES DE OLIVEIRA[3]

[1] Egressa do Curso de Alimentos do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA), Universidade Federal de Pelotas (UFPel) - lauravcosta98@hotmail.com

[2] Egresso do Curso de Alimentos do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA), Universidade Federal de Pelotas (UFPel) - elderpachecodacruz@gmail.com

[3] Docente do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA), Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – elizangelagoliveira1@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Nos dias atuais os consumidores estão cada vez mais preocupados com relação a sua alimentação (SILVA, 2020). O hábito de consumir alimentos açucarados, ricos em sal e gordura tem perdido o lugar para uma dieta cada vez mais balanceada. Recentemente, os alimentos com propriedades funcionais tornaram-se aliados da saúde, prevenindo doenças e proporcionando uma melhor qualidade de vida (FEITOSA et al., 2020). A indústria alimentícia cada vez mais vem se atualizando e apostando em produtos nutritivos e com características funcionais, como os iogurtes.

O iogurte é um produto obtido através do processo de fermentação do leite por bactérias, especialmente *Lactobacillus bulgaricus e Streptococcus thermophilus* (LIMA et al., 2020). Diversas pesquisas ressalvam as características dos iogurtes como um alimento fonte de proteínas, cálcio, fósforo, riboflavina, tiamina, vitamina B12, fosfato, niacina, magnésio e zinco, associado às propriedades funcionais (FEITOSA et al., 2020).

Existem estudos que mostram a importância do iogurte na alimentação de humanos, como a melhoria das funções intestinais, aumento na absorção de minerais, como o cálcio, atuando na prevenção de doenças, como hipertensão, diabetes e osteoporose (COSTA et al., 2015; SILVA, 2017). Em face disso, com o objetivo de avaliar o consumo e a influência de compra de iogurtes foi realizado um estudo de mercado com a população local.

2. METODOLOGIA

Para a realização deste estudo de mercado, disponibilizou-se um questionário estruturado composto por sete questões objetivas, através da plataforma Google Forms. As quais foram respondidas ao acaso por sessenta e três indivíduos não treinados.

O estudo de mercado iniciou-se com questões abordando dados socioeconômicos, sendo, gênero (feminino ou masculino); idade (menor que 20; igual ou maior que 20 a 30 anos ou maior do que 30 anos); renda (de menos que um salário mínimo; de 1 a 2 salários mínimos; de 3 a 4 salários mínimos ou mais

de 4 salários mínimos); escolaridade (ensino médio completo; superior incompleto; superior completo ou pós-graduação) e sobre os hábitos de consumo de iogurte foram realizados os seguintes questionamentos: com que frequência você consome iogurte? (diariamente; as vezes ou não consumo); qual classificação que você costuma comprar? (diet; light; sem lactose ou convencional) e o que lhe influencia na hora de comprar o produto? (marca; rótulo; preço ou tipo).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base na avalição dos dados socioeconômicos, 84,1% dos indivíduos que responderam o questionaram são do gênero feminino e 15,9% do gênero masculino. A maioria possui menos que vinte anos (54%), 30,2% possuem igual ou mais que 20 anos até trinta anos de idade e 15,9% possuem mais que 30 anos. Destes, 44,4% possuem o ensino superior incompleto, 25,40% possuem o ensino médio completo, 17,4% possuem pós-graduação e 12,7% possuem o superior completo. Em relação a renda mensal, 33,3% indicaram ter renda menor que um que um salário mínimo, 23,8% de um a dois salários mínimos, 23,8% de três a quatro salários mínimos e 19% mais que quatro salários mínimos.

Embora, o número de indivíduos com o ensino médio completo seja maior que os demais, a maioria alegou receber menos que um salário mínimo, podendo estar diretamente relacionado com o fato da maioria destes, serem estudantes de graduação, e ainda, não possuírem um emprego formal.

Sobre os hábitos de consumo de iogurte, a minoria dos indivíduos questionados (3,2%) não possui o hábito de consumir iogurte, 19% consume iogurte diariamente e a maioria (77,8%) possui o hábito de consumir as vezes. Uma possível explicação seria que nos últimos anos, houve grandes mudanças na vida da sociedade, como: grandes empregos, maiores níveis de estudos, uso intensivo do carro, grande industrialização, e em consequência disso, procurando ganhar tempo, a população tem buscado cada vez mais por alimentos prontos, como por exemplo, minimamente processados, alimentos congelados, alimentos enlatados, biscoitos, *fast-foods*, iogurtes e diversos outros (LEAL, 2010; MOITA; GUERRA, 2012)

Com relação a classificação dos iogurtes mais procurados, os convencionais se destacam com 79,40%. No entanto, os iogurtes light (12,07%), sem lactose (5%) e diet (3,40%), também apresentam uma demanda de busca. Essa maior procura por iogurtes convencionais, muitas vezes pode estar correlacionada com a influência que as crianças tem sobre seus pais, consequentemente, influenciado na decisão das compras de casa (SOARES et al, 2013).

Evidenciou-se que a maior influência na hora da compra de iogurtes, é pelo tipo (39,7%), estando fortemente relacionado com a classificação, sendo, convencional, light, diet, sem lactose, convencional ou outro. Ainda, 27%, 23,8% e 9,5% dos indivíduos são influenciados pelo preço, marca e rotulo, respectivamente.

4. CONCLUSÕES

A maioria dos indivíduos que responderam o questionaram eram do gênero feminino (84,1%), tinham menos que vinte anos (54%), recebiam menos que um salário mínimo (33,3%) e possuíam o ensino superior incompleto (33,3%). Com o estudo de mercado, foi possível perceber que o iogurte é um alimento bastante presente na alimentação, em que 19% consome diariamente e 77,8% consome as vezes. Já em relação as maiores influências na hora de decisão da compra de iogurtes, o tipo (39,7%) e preço (27%), são as opções que mais relevantes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COSTA, M. F.; CARDOSO, M. N. V.; CRUZ, A. G.; SILVA, M. C. **Desenvolvimento e Caracterização de Iogurte Grego Simbiótico Sabor Baunilha**, IFRJ. Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: http://www.ifrj.edu.br/sites/default/files/webfm/images/JPAL-13.pdf>. Acesso em: agosto de 2020.

FEITOSA, V. B. D.; OLIVEIRA, E. N. A. De.; SOUZA, R. L. A. De.; FEITOSA, B. F.; FEITOSA, R. M. Physico-chemical stability of honey-sweetened (*Apis mellifera* L.) yoghurt. **Ciência Animal Brasileira**, v.21. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1809-6891v21e-50923>. Acesso em: agosto de 2020.

LEAL, D. Crescimento da alimentação fora do domicílio. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 17, n. 1, p. 123-132, 2010.

LIMA, N. P.; MELO, N. M. V.; NASCIMENTO, L. C. S.; FILHO, J. M. De M. Physical-chemical and sensorial analysis of yogurts produced with buffala milk, goat and cow. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 1, p. 5184-5192, 2020.

MOITA, R. M. S. M.; GUERRA, A. Entradas e bandeiras: estratégia de interiorização das cadeias de fast-food. **ERA**, v. 52, n.1, p.85-98, 2012.

SILVA, A. G. F.; BESSA, M. M.; SILVA, J. R. Elaboração e caracterização físico-química e sensorial de iogurte *light* prebiótico adoçado com mel. Elaboration and physicochemical and sensory characterization of prebiotic yogurt sweetened with honey. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, v. 72, n. 2, p. 74-84, 2017.

SILVA, R. T.; ASSIS, B. B. T.; MONÇÃO, É. C.; FERNANDES, J. M.; SILVA, M. E. S.; GRILO, M. M. S.; COUTINHO, T. P. A. Microbiological and physical and chemical analysis of greek type added pitanga jelly (*eugenia uniflora* l.). **Brazilian Journal of Development.,** Curitiba, v. 6, n. 5, p. 24660-24677, 2020.

SOARES, S. A.; BORGES, A. R.; KOIKE, A.; ALMEIDA, K. A Força da Publicidade Infantil: Composto de Marketing e as Embalagens dos Produtos Alimentícios da Turma da Mônica. In: **XXXVI Congresso Brasileiro de Ciências da Comunicação** – Manaus, 2013.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

CONSUMO DE IOGURTE E INFLUÊNCIA DA COMPRA: UM ESTUDO DE MERCADO

LAURA DE VASCONCELOS COSTA[1], ÉLDER PACHECO DA CRUZ[2], ELIZANGELA GONÇALVES DE OLIVEIRA[3]



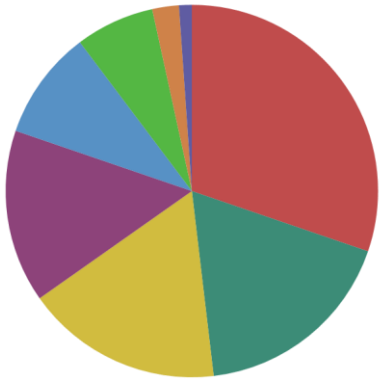
Funções intestinais
Absorção de minerais
Previne doenças

Estudo de Mercado

Google Forms

63 indivíduos não treinados

- Gênero;
- Idade;
- Renda;
- Escolaridade;
- Com que frequência você consome iogurte?;
- Qual classificação que você costuma comprar?;
- O que lhe influencia na hora de comprar o produto?.



- ✓ Gênero feminino (84,1%);
- ✓ Menos que vinte anos (54%);
- ✓ Recebiam menos que um salário mínimo (33,3%);
- ✓ Ensino superior incompleto (33,3%);
- ✓ 19% consome iogurte diariamente e 77,8% consome as vezes;
- ✓ As maiores influências na decisão da compra são o tipo (39,7%) e preço (27%).

FONTE DE CARBONO LIPÍDICA NA INDUÇÃO DA SÍNTESE DE LIPASE POR *YARROWIA LIPOLYTICA*

NATÁLIA MADRUGA ARRIEIRA[1]; AMANDA WERMELINGER BORGES[2]; SUSAN HARTWIG DUARTE[3]

[1]*Universidade Federal do Rio Grande - FURG – nataliamadruga.arrieira@gmail.com*
[2]*Universidade Federal do Rio Grande - FURG – amandawermelinger@outlook.com*
[3]*Universidade Federal do Rio Grande - FURG – susanduarte@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

A levedura oleaginosa *Yarrowia lipolytica* é bastante estudada tanto pela capacidade de acúmulo lipídico quanto por produzir metabólitos de interesse industrial, tais como as lipases. As lipases se destacam no cenário biotecnológico por possuírem características como eficiência e ampla seletividade, participando da produção de importantes moléculas nas áreas farmacêutica, química, cosmética e de alimentos (BASSO; SERBAN, 2019). A produção de lipases por micro-organismos está diretamente ligada às condições do meio de cultivo, como fonte de carbono, pH, temperatura e pode ter sua síntese induzida por fontes de carbono hidrofóbicas (substratos lipídicos) (FABISZEWSKA et al., 2014). O azeite de oliva pode ser empregado como indutor, visto que é composto por mais de 70% de ácido oleico, componente conhecido por ativar os genes induzíveis da levedura para a produção dessa subclasse de hidrolases (WANG et al., 2008).

Além disso, sabe-se que a glicose é o substrato mais facilmente assimilado pela maioria dos micro-organismos, como a levedura *S. cerevisiae* cujo metabolismo apresenta o chamado efeito Crabtree KAVŠČEK et al. (2015), garantindo que a glicose quando disponível seja a primeira a ser utilizada. Entretanto, a *Yarrowia lipolytica* é conhecida por ter a capacidade de se multiplicar na presença de fontes alternativas de carbono, como pentoses, glicerol KAVŠČEK et al. (2015) e substratos lipídicos (FABISZEWSKA et al., 2014). Dessa forma, este trabalho propôs a comparação entre a utilização de uma fonte convencional de carbono, a glicose, e de uma fonte de substrato lipídico, o azeite de oliva, como única fonte de carbono na produção de lipases pela levedura *Yarrowia lipolytica*.

2. METODOLOGIA

A levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1095 foi utilizada para a produção de lipase em cultivo submerso. O inóculo foi preparado transferindo células do micro-organismo cultivadas em um tubo inclinado para um Erlenmeyer totalizando 200 mL do meio de cultivo proposto por FRENGOVA et al. (1994), composto por ($g.L^{-1}$): 40 glicose, 8,0 KH_2PO_4, 0,5 $MgSO_4.7H_2O$ e 3,0 extrato de levedura. O inóculo foi cultivado em agitador tipo *shaker* a 28°C, 180 rpm durante 24 h. Os cultivos foram inoculados (10% $v.v^{-1}$) em frascos tipo Erlenmeyer de 500 mL com 200 mL de cada meio estudado: meio padrão, utilizando meio de cultivo proposto por FRENGOVA et al. (1994), e o mesmo

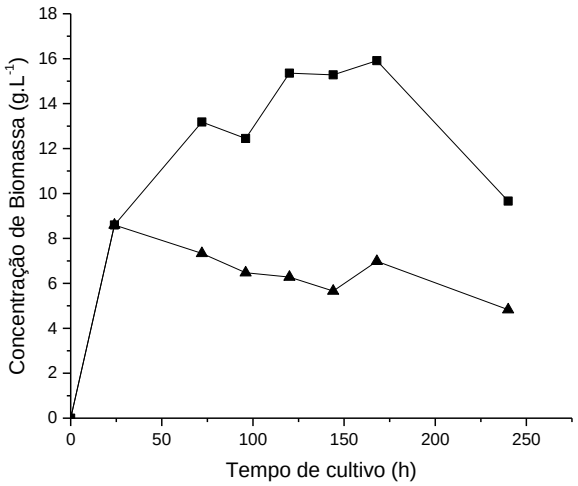
meio com indutor, sem a presença de glicose e com azeite de oliva (10 $g.L^{-1}$) e Triton X-100 (2 $g.L^{-1}$). Os ensaios foram conduzidos em duplicata em agitador tipo *shaker* a 28°C, 180 rpm durante 240 h.

Durante os cultivos, foram acompanhadas as concentrações de biomassa e a atividade de lipase extracelular. O crescimento de biomassa foi monitorado seguindo a metodologia proposta por LIU et al. (2013) sendo a densidade óptica correspondente ao valor OD_{600nm} convertida para massa seca através da construção de uma curva padrão. Para as análises, uma alíquota de 5 mL de meio foi centrifugada por 10 min a 4000 rpm, do precipitado resultante da centrifugação mediu-se a concentração de biomassa e o sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade enzimática seguindo a metodologia proposta por SILVA et al. (2005). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 nmol de p-nitrofenol por minuto a pH 8,0 e 37°C.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 representa a curva de concentração de biomassa da levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1095 para os meios de cultivo estudados. É possível perceber que a concentração de biomassa ao longo do tempo nos ensaios com o meio padrão foram maiores em comparação ao meio contendo apenas o azeite de oliva como fonte de carbono e indutor. Como citado anteriormente, a glicose é o substrato mais facilmente assimilado pelos micro-organismos e isso pode ter contribuído para o maior crescimento celular. A concentração máxima de biomassa ($X_{máx}$) obtida no cultivo com meio padrão foi de 15,91 $g.L^{-1}$ em 168 h, para o meio com azeite de oliva foi de 8,60 $g.L^{-1}$ em 24 h.

Figura 1- Curva de concentração de biomassa da levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1095 em meio padrão (■) e em meio com azeite de oliva (▲)



Quanto à produção de lipases, apenas os ensaios com azeite de oliva apresentaram atividade enzimática, os valores são apresentados na Tabela 1.

Esses resultados vão ao encontro do que é dito na literatura quanto à necessidade da presença de uma fonte lipídica que funcione como indutora do gene promotor *LIP2* responsável pela codificação da lipase extracelular na levedura *Yarrowia lipolytica* (FICKERS et al., 2011). FICKERS et al. (2003) em seus estudos com mutantes da levedura em questão, obtiveram resultados baixos de atividade enzimática nos cultivos de *Yarrowia lipolytica* LgX64.81 em que a glicose era a única fonte de carbono disponível, em comparação aos resultados obtidos utilizando-se azeite de oliva e glicerol como indutores. Segundo os autores, isso ocorre devido à enzima hexoquinase, que catalisa o metabolismo de hexoses, estar envolvida na repressão do gene *LIP2.*

Tabela 1- Valores de atividade enzimática do cultivo utilizando meio com azeite de oliva

Tempo de cultivo (h)	Atividade enzimática ($U.mL^{-1}$)
168	53,5 ± 0,016
240	167 ± 0,042

Além disso, é possível perceber que a produção de lipases pela levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1095 ocorreu apenas no período final do cultivo (fase estacionária). PEREIRA-MEIRELLES et al. (2000) sugerem que a produção de lipases está associada ao crescimento celular e que no início do cultivo essas enzimas estão presentes apenas intracelularmente. Em seus estudos, a liberação extracelular de lipase começou apenas quando cerca de 50% da fonte de carbono do meio já havia sido consumida. Ainda, é importante destacar que a utilização de surfactantes como o Triton X-100 aumenta a atividade de lipase extracelular ao causar mudanças na permeabilidade da célula, auxiliando a enzima em sua atuação na interface orgânico-aquosa de soluções emulsionadas (MAGDOULI et al., 2017). Ademais, ressalta-se que a produção de lipases varia de acordo com a concentração de indutor enzimático disponível no meio e com a cepa utilizada.

Portanto, o azeite de oliva cumpriu com a função de induzir a produção de lipases pela levedura e funcionar como única fonte de carbono simultaneamente. Em trabalhos futuros, substratos lipídicos residuais como óleo de motor e óleo de fritura podem ser explorados, diminuindo o custo dos meios de cultivo e valorizando esses resíduos.

4. CONCLUSÕES

O trabalho contribui com os estudos sobre a utilização de um substrato alternativo em cultivos de leveduras como a *Yarrowia lipolytica* para a produção de lipases, sugerindo o uso de um único composto funcionando simultaneamente como fonte de carbono e indutor enzimático.

AGRADECIMENTOS

Ao apoio financeiro (Chamada Universal CNPq 421870/2016-8).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASSO, A.; SERBAN, S. Industrial applications of immobilized enzymes - A review. **Molecular Catalysis**, Amsterdam, v.479, 110607, 2019.

FABIZEWSKA, A.U.; STOLARZEWICZ, I.A.; ZAMOJSKA, W.M.; BIAŁECKA-FLORJAŃCZYK, E. Carbon source impact on *Yarrowia lipolytica KKP 379* lipase production. **Applied Biochemistry and Microbiology**, [S.I], v.50, n.4, p.404–410, 2014.

FRENGOVA, G.; SIMOVA, E.; PAVLOVA, K.; BESHKOVA, B.; GRIGOROVA, D. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. **Biotechnology and Bioengineering**, [S.I], v. 44, n. 8, p. 888-894, 1994.

FICKERS, P.; NICAUD, J. M.; DESTAIN, J.; THONART, P. Overproduction of lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlim, v.63, n.2.p.136–142, 2003.

FICKERS, P.; MARTY, A.; NICAUD, J. M. The lipases from *Yarrowia lipolytica*: Genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v.29, n.6, p.632–644, 2011.

KAVŠČEK, M.; BHUTADA, G.; MADL, T.; NATTER, K. Optimization of lipid production with a genome-scale model of *Yarrowia lipolytica.* **BMC Systems Biology**, [S.I], v.9, 72, 2015.

LIU, Z.; GAO, Y.; CHEN, J.; IMANAKA, T.; BAO, J.; HUA, Q. Analysis of metabolic fluxes for better understanding of mechanisms related to lipid accumulation in oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v.130, n.1, p.144-151, 2003.

MAGDOULI, S.; GUEDRI, T.; TAREK, R.; BRAR, S. K.; BLAIS, J. F. Valorization of raw glycerol and crustacean waste into value added products by *Yarrowia lipolytica*. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v.243, p.57–68, 2017.

PEREIRA-MEIRELLES, F.V.; ROCHA-LEÃO, M.H.M.; SANT'ANNA JR, G. L. Lipase location in *Yarrowia lipolytica* cells. **Biotechnology Letters**, [S.I], v.22, n.1, p.71–75, 2000.

SILVA, W.O.B.; MITIDIERI, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Production and extraction of na extracelular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, Amsterdam v.40, n.1, p.321-326, 2005.

WANG, D.; XU, Y.; SHAN, T. Effects of oils and oil-related substrates on the synthetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* and optimization of the lipase fermentation media. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v.41, n.1, p.30–37, 2008.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA

Saúde única

IV MOSTRA ACADÊMICA

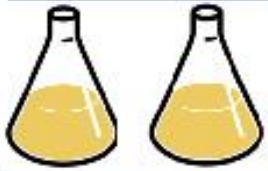
PPGB

FONTE DE CARBONO LIPÍDICA NA INDUÇÃO DA SÍNTESE DE LIPASE POR *YARROWIA LIPOLYTICA*

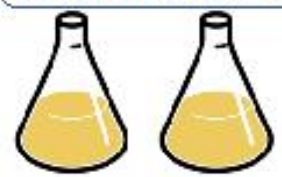
NATÁLIA MADRUGA ARRIEIRA[1]; AMANDA WERMELINGER BORGES[2]; SUSAN HARTWIG DUARTE[3]

Meios de cultivo

Glicose (fonte de carbono)

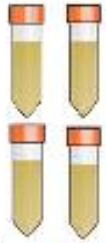


Azeite de oliva (fonte de carbono)



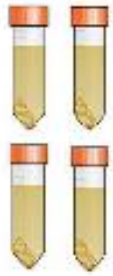


Incubação para a produção de lipases (180 rpm, 28°C)





Centrifugação do meio (diferentes tempos de cultivo)

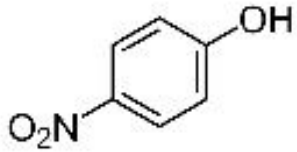


Precipitado: Análise de concentração de biomassa

Sobrenadante: Análise da atividade enzimática

Reação com substrato (pPNP) (37°C por 30 min)





Quantificação da liberação do produto *p*- nitrofenol (atividade enzimática)



Gráficos ***biomassa e atividade enzimática x tempo*** para os cultivos com glicose ou azeite de oliva

OBTENÇÃO DE GUANINA MAGNÉTICA

THEODORO DA ROSA SALLES[1]; FRANCIELE DA SILVA BRUCKMANN[2]; CRISTIANO RODRIGO BOHN RHODEN[3]

[1] Universidade Franciscana - theodoro.rsalles@gmail.com
[2]Universidade Franciscana – francielebruckmann2@gmail.com
[3] Universidade Franciscana – cristianorbr@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Guanina e adenina são bases orgânicas nitrogenadas de grande importância para a formação de DNA e RNA (WANG, et al. 2020). Eles apresentam efeitos no fluxo sanguíneo, na inibição de neurotransmissores e na atividade do adenilato ciclase. A concentração destas no sangue é considerado um indicativo para câncer, AIDS e status da energia das células miocárdicas (ENSAFI, et al., 2013).

A utilização de bases nitrogenadas em trabalhos científicos tem aumentado nos últimos anos. Recentemente NG e seus colaboradores (2018), introduziram guanina em um nanomaterial feito de paládio e óxido de grafeno reduzido (Pd/rGO) para eletrooxidação de metanol. Também foi relatado a funcionalização de nanotubos de carbono de parede simples com guanina, timina e adenina (SILAMBARASAN; IYAKUTTI;VASU; 2014).

As nanopartículas magnéticas vêm ganhando cada vez mais atenção em estudos por possuírem características que as tornam promissoras em experimentos de adsorção e atividade biológica (AL-JABARI et al.,2019), destacando-se as nanopartículas com propriedades superparamagnéticas, como a ferrita (Fe_3O_4). Elas respondem de forma rápida e forte a um campo magnético e apresentam alta biocompatibilidade, podendo serem utilizadas na modificação de estruturas (SURESHKUMAR et al., 2016).

Neste contexto, o objetivo deste tralho foi obter guanina magnética para posteriormente investigar suas possíveis aplicações em diversas áreas, sejam elas tecnológicas ou biológicas.

2. METODOLOGIA

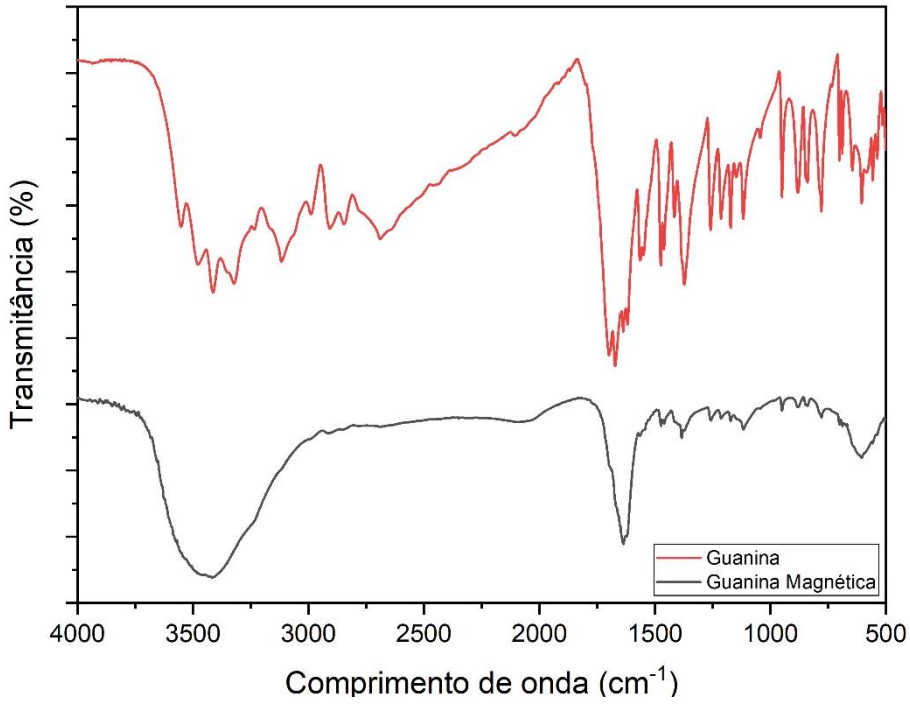
A magnetização da guanina foi realizada a partir do método de Rhoden et al (2017), utilizou-se um balão de fundo redondo de 250 mL contendo 100 mL de água ultrapura previamente desoxigenada, sequencialmente, adicionou-se 100 mg de guanina, 500 mg de cloreto ferro II ($FeCl_2$) (Sigma Aldrich®) e hidróxido de amônia até atingir pH oxidante. Em seguida, a mistura foi submetida a radiação ultrassônica a 150 W e ao aquecimento, intercalando as etapas. Após, a solução foi transferida para um béquer e com o auxílio de um imã, o material obtido foi lavado repetidas vezes com acetona e seco a 50ºC para evaporação do solvente remanescente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A espectroscopia de infravermelho é uma ferramenta importante, pois fornece evidências da presença de grupos funcionais na estrutura orgânica. O infravermelho médio compreende números de onda entre 4000 - 400 cm^{-1}, região de maior utilidade para caracterizar as estruturas de carbono.

O equipamento utilizado para caracterizar as amostras sintetizadas neste trabalho foi FTIR da Perkin-Elmer, modelo Spectro One. As pastilhas foram obtidas com 2 mg de amostra e 200 mg do suporte (KBr). O espectro aparece, em forma de bandas, resultante das vibrações das moléculas ao absorverem a radiação infravermelha (RHODEN, 2018).

Figura 1 – Espectroscopia de infravermelho da guanina e da guanina magnética.



Fonte: Construção do autor.

Na figura acima são apresentados os espectros de infravermelho (FTIR) da guanina e da guanina magnética obtida. Os picos de absorção da guanina observados em 3535 e 2850 cm^{-1} correspondem ao estiramento da ligação O-H e a deformação axial simétrica de CH_2 respectivamente, em 1600-1500 cm^{-1}, bandas atribuídas à deformação axial da ligação C=O e ao estiramento da ligação C-O proveniente do carbono carboxílico, na região de 1500 a 1400 cm^{-1} envolve a deformação axial da ligação C-C, próximo de 1100 cm^{-1} representando alongamento C-O, em 900 cm^{-1} e em torno de 675 cm^{-1} representam a deformação angular das ligações de C-H (COSKUN, et al., 2020).

Além dos picos constantes da guanina, observou-se o aparecimento sem interferência da banda na faixa de 600 cm^{-1} originada pelas vibrações de estiramento de Fe-O indicando a presença de Fe_3O_4 incorporado a guanina (LOPEZ et al., 2010; RHODEN et al., 2017).

4. CONCLUSÕES

A espectroscopia de FTIR, juntamente com a aproximação do material obtido a um campo magnético foi possível uma confirmação inicial da incorporação de nanopartículas magnéticas na estrutura da guanina. Ressalta-se a necessidade de novas técnicas de caracterização para a partir destas iniciar a testagem da guanina magnética obtida em protocolos de atividade biológica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-JABARI, M. H. et al. Adsorption study of levofloxacin on reusable magnetic nanoparticles: Kinetics and antibacterial activity. **Journal of Molecular Liquids**, v. 291, p. 111249, 2019.

COSKUN, Halime et al. Cofunction of Protons as Dopant and Reactant Activate the Electrocatalytic Hydrogen Evolution in Emeraldine-Polyguanine. **Advanced Materials Interfaces**, v. 7, n. 2, p. 1901364, 2020.

ENSAFI, A. A. et al. Simultaneous determination of guanine and adenine in DNA based on NiFe2O4 magnetic nanoparticles decorated MWCNTs as a novel electrochemical sensor using adsorptive stripping voltammetry. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 177, p. 634-642, 2013.

LOPEZ, J. A. et al. Synthesis and characterization of Fe_3O_4 magnetic nanofluid. **Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales,** v. 30, n. 1, p. 60-66, 2010.

NG, J. C. et al. Novel palladium-guanine-reduced graphene oxide nanocomposite as efficient electrocatalyst for methanol oxidation reaction. **Materials Research Bulletin**, v. 112, p. 213-220, 2019.

RHODEN, C., R., B. et al. Síntese fácil e direta do Óxido de Grafeno Magnético. **Disciplinarum Scientia**, v. 18, n. 3, p. 389-397, 2017.

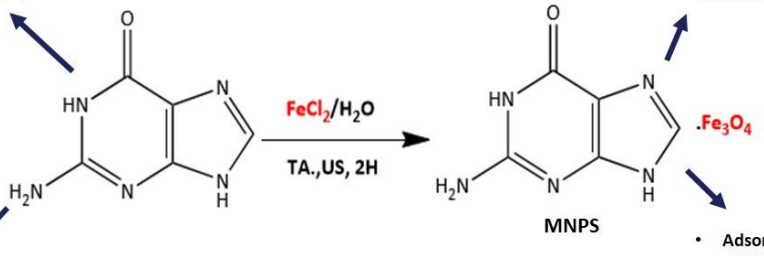
RHODEN, C. R. B. **Síntese de análogos de peptídeos incorporados a materiais nanoparticulados de carbono funcionalizados via reações multicomponentes**. 2018. 107f. Tese de Doutorado (Doutor em Nanociências), Universidade Franciscana, 2018.

SILAMBARASAN, D.; IYAKUTTI, K.; VASU, V. Functionalization of single-walled carbon nanotubes with uracil, guanine, thymine, and L-alanine. **Chemical Physics Letters**, v. 604, p. 83-88, 2014.

SURESHKUMAR, V. et al. Fabrication of chitosan–magnetite nanocomposite strip for chromium removal. **Applied Nanoscience**, v. 6, n. 2, p. 277-285, 2016.

WANG, X. et al. Guanine-guided time-resolved luminescence recognition of DNA modification and i-motif formation by a terbium (III)-platinum (II) complex. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 150, p. 111841, 2020.

- Incorporação em nanomateriais;
- Estudos de adsorção;



MNPS

- Atividade biológica promissora;
- Estudos de adsorção;

- Formação de DNA e RNA;
- Indicativo para câncer e AIDS;

- **Adsorção;**
- **Atividade antinociceptiva;**
- **Atividade citotóxica**

ÁCIDOS CLOROGÊNICOS E SUA BIOACESSIBILIDADE

Bruna Trindade Paim[1]; Vanessa Galli[3]; Adriana Dillenburg Meinhart[3]

[1] UFPel Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – brunapaaim@gmail.com
[3]UFPel Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – adrianadille@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os ácidos clorogênicos são compostos hidroxinâmicos, com a presença de ésteres, com estruturas de ácidos caféicos e ácidos quínicos. Podem ser classificados com base no tipo, número e posição do grupamento acila, (Parras et al.,2007) e incluem vários isômeros. Os mais abundantes na natureza são ácido 3-cafeoilquínico (3-CQA), ácido 4-cafeoilquínico (4-CQA), ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA), ácido 3,4-dicafeoilquínico (3,4-DQA), ácido 3,5-dicafeoilquínico (3,5-DQA) e ácido 4,5dicafeoilquínico (4,5-DQA) (Meinhart et al., 2019).

Tais compostos estão presentes em matrizes vegetais como: café, erva mate, chás, maças, pêra, uva, goiaba, cenouras, kiwis, ameixas, batatas, folhas de tabaco e tomates (Chen et al., 2019; Stalmach et al., 2010; Limwachiranon et al., 2019; Meinhart et al., 2019).Estes possuem atividades benéficas ao organismo humano, como atividades antioxidantes, anti-inflamatória, antimicrobiana, anti-hipertensiva, antitumoral (Aree, 2019; Campos et al., 2017; Feng et al., 2016;Kremr et al., 2016; Meinhart et al., 2019).

No entanto, os ácidos clorogênicos sofrem degradação parcial ao passar pelo processo digestório. Por esse motivo, alguns pesquisadores têm realizado processos de encapsulamento, a fim de garantir maior estabilidade aos compostos para chegarem até o trato gastrointestinal, o que acarreta maior possibilidade de absorção. Esta revisão tem como objetivo compilar informações de trabalhos disponíveis na literatura até o presente momento sobre os ácidos clorogênicos e sua bioacessibilidade.

2. METODOLOGIA

O trabalho foi desenvolvido através de pesquisas bibliográficas em bases de dados, Scopus, Science direct, Periodicos Capes. As palavras utilizadas nas buscas todas as plataformas de pesquisas foram “chlorogenic acid’’; “encapsulation chlorogenic acid’’; “biodisbibibility chlorogenic acid’’ e “bioaccessibility chlorogenic acid’’, publicadas até 31 de julho de 2020.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Há estudos relacionados ao encapsulamento de compostos clorogênicos e seu comportamento na bioacessibilidade. Limwachiranon et al. (2019) buscou aumentar a estabilidade e bioacessibilidade de uma solução de ácidos clorogênicos através de soluções complexadas com diferentes agentes encapsulantes de amidos como, amido de batata, amilose e amilopectina. Avaliou a formação dos complexos de ácidos clorogênicos com as diferentes fontes e concentrações de amidos, apresentando o melhor resultado a amilopectina com concentração 100%. As analises *in vitro* digeriram o material encapsulado na fase gástrica. Pode-se observar que quando em pH 2,5 reteve a máximo de ácidos clorogênicos, o que auxilia na bioacessibilidade, tendo em vista o pH durante o processo de digestão gástrica. Além disso, 81,14% dos compostos clorogênicos encapsulados com amilopectina foram absorvidos após a digestão gastrointestinal. Sendo assim, percebe-se que utilizar a complexação com amilopectina melhora a estabilidade de ácidos clorogênicos.

Nallamuthu et al. (2014) realizou um encapsulado de ácidos clorogênicos em nanopartículas de quitosana, através do método de gelificação iônica. O preparado de nanopartículas mostrou um perfil de liberação controlada e uma atividade antioxidante em condições *in vitro*. Eles também mantiveram uma estabilidade ao calor, podendo ser utilizados em vários tipos de alimentos processados termicamente. Sabe-se que as nanopartículas são conhecidas por transportar compostos bioativos através da barreira mucosa e, portanto, aumentam a biodisponibilidade, podendo ser um transportador adequado para melhor distribuição de ACG em alimentos.

Lozano-Vazquez et al. (2015) encapsulou ácido clorogênico em alginato de cálcio preenchido com amido de tapioca modificado em hidrogéis. Também avaliou o tamanho, textura e viscoelasticidade dos grânulos, além da eficiência de aprisionamento de ácidos clorogênicos, atividade antioxidante e liberação sob condições gastrointestinais simuladas. Concluindo que a utilização desse material para o encapsulamento de ácido clorogênico, atinge menor tamanho de partícula e maior esfericidade do (que sua versão feita apenas com cálcio alginato). Isso ocasionou uma liberação mais rápida de ácidos clorogênicos no trato gastrointestinal, sendo uma alternativa barata e adequada para encapsulamento e liberação de bioativos

Feng et al. (2016) usou um lipossoma carregado de ACG (CAL), com a finalidade de aumentar a biodisponibilidade oral através de nanopartículas. A análise farmacocinética de CAL, em comparação com ácido clorogênico mostrou um valor mais alto de concentração (6,42 e 3,97, respectivamente para CAL e ACG) e um tempo máximo (15 e 10 minutos respectivamente) com Aumento de 1,29 vezes na biodisponibilidade oral relativa. Em teste com camundongos, o CAL acumulou no fígado, indicando potencial de direcionamento hepático, demonstrando efeitos hepatoprotetores significativos.

No estudo de Stalmach et al. (2010), foi analisada a absorção intestinal dos ACG's e metabólitos após uma única dose de ingestão de café (200 ml) em humanos com ileostomia, analisando o fluido ileal e de urina 0-24 horas pós-ingestão. Revelou a presença total de ACG e seus metabólitos recuperados no fluido ileal correspondeu a 71%, dos 385 μ mol presentes no café inicialmente, indicando uma absorção de 29% desses compostos na digestão no intestino delgado, implicam que cerca de um terço dos ácidos clorogênicos ingeridos foram absorvidos ao entrar na corrente sanguínea a partir do intestino delgado. Em comparação ao excretado pela urina 8% foram encontrados, sendo ácido caféico e ácido ferúlico, liberados pela hidrólise da sulfatase. O autor concluiu que a quantidade de ACG metabolizados variam conforme o conteúdo do cólon de cada ser humano. Havendo uma melhor elucidação das vias envolvidas no metabolismo pós-ingestão de ácidos clorogênicos e também distinguiu entre os compostos absorvidos no intestino delgado e grosso.

4. CONCLUSÕES

Existem diversos tipos de materiais para utilizar na encapsulação de ácidos clorogênicos para diferentes finalidades de aplicação e sua bioacessibilidade. Após a análise dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que ainda há necessidade da realização de novos estudos, para concluir a melhor forma de disponibilidade dos compostos clorogênico, tendo em vista o material utilizado no encapsulamento e sua disponibilidade na ingestão humana.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AREE, T. Understanding structures and thermodynamics of β-cyclodextrin encapsulation of chlorogenic , caffeic and quinic acids : Implications for enriching antioxidant capacity and masking bitterness in coffee. **Food Chemistry**, v. 293, n. January, p. 550–560, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.084>.

CAMPOS, A. et al. Technological stability of solid lipid nanoparticles loaded with phenolic compounds : Drying process and stability along storage. v. 196, p. 1–10, 2017.

CHEN, Y. et al. Talanta A novel electrochemical sensor based on core-shell-structured metal-organic frameworks : The outstanding analytical performance towards chlorogenic acid. **Talanta**, v. 196, n. December 2018, p. 85–91, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.12.033>.

FENG, Y. et al. Enhanced oral bioavailability and in vivo antioxidant activity of chlorogenic acid via liposomal formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.01.081>.

KREMR, D. et al. Talanta On-line monitoring of in-vitro oral bioaccessibility tests as front-end to liquid chromatography for determination of chlorogenic acid isomers in dietary supplements. **Talanta**, p. 1–8, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.12.082>.

Limwachiranon, J., Huang, H., Li, L., Lin, X., Zou, L., Liu, J., Zou, Y., Aalim, H., Duan, Z., Luo, Z. Enhancing stability and bioaccessibility of chlorogenic acid using complexation with amylopectin: A comprehensive evaluation of complex formation, properties, and characteristics, **Food Chemistry** 2019.Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125879>

LOZANO-VAZQUEZ, G. et al. Food Hydrocolloids Effect of the weight ratio of alginate-modi fi ed tapioca starch on the physicochemical properties and release kinetics of chlorogenic acid containing beads. **Food hydrocolloids**, v. 48, p. 301–311, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.032>.

MEINHART, A. D. et al. Chlorogenic and ca ff eic acids in 64 fruits consumed in Brazil. **Food Chemistry**, v. 286, n. May 2018, p. 51–63, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.004>.

NALLAMUTHU, I.; DEVI, A.; KHANUM, F. ScienceDirect Chlorogenic acid loaded chitosan nanoparticles with sustained release property , retained antioxidant activity and enhanced bioavailability. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, n. 2014, p. 3–11, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2014.09.005>.

Parras, P., Martínez-Tomé, M., Jiménez, A. M., & Murcia, M. A. (2007). Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures. **Food Chemistry**, 102(3), 582–592. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.037.

STALMACH, A. et al. Bioavailability of chlorogenic acids following acute ingestion of coffee by humans with an ileostomy. v. 501, p. 98–105, 2010.

VILAS-BOAS, A. A. et al. Chlorogenic acids composition and the impact of in vitro gastrointestinal digestion on espresso co ff ee from single-dose capsule. **Food Research International**, v. 134, n. October 2019, p. 109223, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109223>.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

ÁCIDOS CLOROGÊNICOS E SUA BIOACESSIBILIDADE

Bruna Trindade Paim[1]; Vanessa Galli[3]; Adriana Dillenburg Meinhart[3]



DESENVOLVIMENTO DE FIBRAS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE *ELECTROSPINNING*: EFEITOS DOS PARÂMETROS OPERACIONAIS E FÍSICO-QUÍMICOS

EDUARDO SILVEIRA RIBEIRO[1]; BRUNA SILVA DE FARIAS[2]; PATRÍCIA DIAZ DE OLIVEIRA[3]

[1]Universidade Federal de Pelotas1 – eduardosilveiraribeiro@yahoo.com
[2]Universidade Federal do Rio Grande – bruna.farias.furg@gmail.com
[3]Universidade Federal de Pelotas – bilicadiaz@@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Desde o final do século 20, a técnica de *electrospinning* vem ganhando cada vez mais espaço dentro da comunidade científica, assim como na área industrial. Com o desenvolvimento da nanotecnologia, essa técnica tem se tornado uma das mais utilizadas para o desenvolvimento de fibras e cápsulas na escala micro ou nanométrica. Atualmente, existem mais de 100 polímeros, de origem sintética ou natural, que já foram utilizados para a formação de fibras ou cápsulas a partir da técnica de *electrospinning*. Entretanto, mesmo com o uso generalizado da técnica, a compreensão desse método ainda é bastante limitado, uma vez que diversos parâmetros podem afetar a eficiente formação das nanofibras ou nanocápsulas (HAIDER; HAIDER; KANG, 2018).

O sistema para aplicação da técnica de *electrospinning* é composto principalmente por quatro partes: uma seringa, contendo a solução polimérica, uma agulha metálica, uma fonte de alta tensão e um coletor metálico. O processo se inicia quando as cargas elétricas geradas pela fonte de energia se movem para a solução polimérica através da agulha metálica localizada na ponta da seringa, acarretando na instabilidade da solução. À medida que a seringa é pressionada, a solução polimérica passa pela agulha e dirige-se ao coletor. Nesse momento, em que a solução está saindo da agulha, ocorre uma repulsão entre as moléculas da solução, devido à carga elétrica, capaz de gerar uma força que se opõem a tensão superficial, indo na direção do campo elétrico. Um aumento no campo elétrico faz com que a gota esférica se deforme e assuma uma forma cônica. Nessa fase, as nanofibras emergem a partir da gotícula da solução polimérica cônica, conhecida como cone de Taylor, as quais são coletadas no coletor metálico, o qual é mantido a uma distância otimizada da seringa. Um jato de carga estável pode ser formado apenas quando a solução polimérica possui força coesiva suficiente. Durante o processo, as forças das cargas internas e externas causam um efeito chicote no jato de liquido em direção ao coletor. Esse efeito permite que as cadeias do polímero dentro da solução se estiquem e gerem as fibras com diâmetros suficientemente reduzidos para serem chamadas de nanofibras (BAE et al., 2013; HAIDER et al., 2013).

As fibras produzidas possuem uma vasta empregabilidade nas mais diferentes áreas. Desde encapsulação de compostos bioativos e probióticos, imobilização de enzimas, sistema carreador de fármacos, produção de *scaffolds* para tratamento de queimaduras e feridas, engenharia de tecidos, entre diversas

outras aplicações (HAIDER; HAIDER; KANG, 2018; LI et al., 2002; SKRLEE et al., 2019; WANG et al., 2005)

2. PARÂMETROS OPERACIONAIS DA TÉCNICA DE *ELECTROSPINNIG*

Dentro desse processo, diversos parâmetros capazes de influenciar na formação e estrutura das fibras já foram analisados. Existem diversos estudos com relação a voltagem aplicada, taxa de alimentação e distância entre o capilar e o coletor, os quais dizem respeito aos parâmetros operacionais do próprio equipamento (TEO; RAMAKRISHNA, 2006).

2.1 **Voltagem aplicada**

Com relação a voltagem aplicada, é um fato conhecido que a sua aplicação na solução polimérica, através do capilar é o fator responsável por deformar a gota gerada na ponta capilar e formar o cone de Taylor, gerando assim as fibras ultrafinas. Esse fenômeno só ocorre a partir de um certo valor mínimo de voltagem aplicada, conhecida como voltagem crítica (LAUDENSLAGER; SIGMUND, 2012).

Esse valor crítico varia de polímero para polímero. Um aumento no valor da voltagem aplicada, a partir do valor crítico, também já foi descrito como sendo o responsável pela obtenção de fibras de menor diâmetro. Nesse caso, o aumento da voltagem aplicada teria uma capacidade maior de estirar a solução polimérica em correlação com a repulsão de cargas dentro do jato polimérico (SILL; RECUM, 2008). Da mesma maneira, valores muito acima da voltagem crítica possuem efeito oposto, gerando fibras de maior diâmetro e com a formação de gotas. Nesse caso a voltagem aplicada acarreta em uma diminuição do tamanho do cone de Taylor e aumentar a velocidade do jato formado, isso em uma mesma taxa de alimentação (HAIDER; HAIDER; KANG, 2018).

2.1 **Taxa de alimentação**

A taxa de alimentação é uma das responsáveis pela morfologia das fibras geradas. Para a obtenção de fibras uniformes e sem a formação de gotas é necessário um valor crítico de taxa de alimentação para cada solução polimérica. Valores muito acima do valor crítico podem ocasionar na formação de fibras com gotas, diâmetros e poros maiores, assim como alterar sua conformação, obtendo-se fibras no formato de fitas. Esse fenômeno ocorre, pois, uma alta taxa de alimentação inviabiliza a evaporação completa do solvente durante o estiramento da solução polimérica, do mesmo modo que interfere também no próprio estiramento da solução polimérica, entre o capilar e o coletor. (HAIDER; HAIDER; KANG, 2018).

2.1 **Distância entre o capilar e o coletor**

A distância entre o capilar e o coletor também desempenha um importante papel na morfologia das fibras geradas a partir da técnica de *electrospinning*, existindo uma distância ideal para cada sistema. Destaca-se a importância desse parâmetro, uma vez que a alteração do mesmo acarreta na alteração do tempo de deposição, na taxa de evaporação, assim como toda a estabilidade do jato formado (MATABOLA; MOUTLOALI, 2013). Distâncias muito baixas, normalmente, acarretam em fibras defeituosas e de diâmetros maiores, podendo diminuir esse diâmetro com o aumento da distância. Desse modo, uma distância crítica deve ser mantida, para gerar fibras lisas e uniformes (HAIDER; HAIDER; KANG, 2018; ZHANG et al., 2005).

3. PARÂMETROS DA SOLUÇÃO DE TRABALHO APLICADA NA TÉCNICA DE *ELECTROSPINNIG*

Da mesma forma, existem os parâmetros da solução aplicada na técnica, também muito estudados, como a massa molar, viscosidade e a condutividade da solução (TEO; RAMAKRISHNA, 2006).

3.1 **Massa molar e viscosidade**

O fenômeno de *electrospinning* depende principalmente do estiramento uniaxial da solução polimérica em forma de jato carregado. Essa capacidade de estiramento está diretamente relacionada com a concentração, massa molar e, consequentemente, viscosidade da solução polimérica (PILLAY et al., 2013). Em concentrações e/ou massa molares muito baixas, o campo elétrico aplicado e a tensão superficial, diretamente relacionados ao nível de entrelaçamento da cadeia polimérica, causam o rompimento desse entrelaçamento, gerando fragmentos menores antes de alcançarem o coletor, produzindo apenas gotas ou fibras com gotas. Um aumento na concentração da solução polimérica e/ou massa molar do polímero acarreta em um aumento na viscosidade da solução, esse fenômeno será responsável pelo aumento do nível de entrelaçamento entre as cadeias poliméricas da solução. Nessa situação, o entrelaçamento das cadeias poliméricas se torna suficiente para superar a tensão superficial e produzir fibras uniformes sem a formação de gotas. Entretanto, um aumento muito acima de um valor crítico (valor no qual são obtidas as fibras uniformes) para este parâmetro dificulta a passagem da solução pelo capilar da seringa, o que pode comprometer o escoamento da solução polimérica e, consequentemente, a formação de fibras (HAIDER et al., 2013).

3.1 **Condutividade**

Outro parâmetro da solução importante para a formação de fibras a partir da técnica de eletro fiação é a condutividade da solução polimérica, visto que ela afeta a formação do cone de Taylor e o diâmetro das fibras. Soluções com baixa condutividade não possuem carga suficiente para formar o cone de Taylor, inviabilizando todo o processo de *electrospinning*. Enquanto que soluções com condutividades muito altas também impedem a formação do cone de Taylor (SUN et al., 2014).

4. PARÂMETROS AMBIENTAIS NA TÉCNICA DE *ELECTROSPINNIG*

Os parâmetros ambientais também são importantes para a produção de fibras a partir da técnica de *electrospinning*. Destacam-se a umidade relativa do ar e a temperatura como sendo capazes de influenciar na formação, no diâmetro e na morfologia das fibras formadas. A umidade é capaz de alterar o diâmetro da fibra, visto que ela afeta diretamente a secagem do jato. Em que normalmente uma diminuição do diâmetro da fibra é obtida com o aumento da umidade. Enquanto a temperatura é capaz de alterar o diâmetro das fibras através de duas formas distintas. O aumento da mesma aumenta a taxa de evaporação do solvente e diminui a viscosidade da solução, o que pode acarretar na diminuição do diâmetro das fibras (DE VRIEZE et al., 2009).

3. CONCLUSÃO

Existem muitas variáveis dentro da técnica de *electrospinning*, mesmo sendo uma técnica já amplamente utilizada e para uma gama cada vez maior de polímeros. Estudos futuros ainda irão avançar muito nessa área, possibilitando

um domínio maior sobre o controle das fibras formadas, dos polímeros utilizados e decorrente disso, novas aplicações também tendem a surgir.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAE, H. S.; HAIDER, A.; SELIM, K. M. K.; KANG, D. Y.; KIM, E. J.; KANG, I. K. Fabrication of highly porous PMMA electrospun fibers and their application in the removal of phenol and iodine. **Journal of Polymer Research**. v. 20, n. 7, p. 1–7, 2013.

DE VRIEZE, S.; VAN CAMP, T.; VELVIG, A.; HAGSTROM, B.; WESTBROEK, P.; DE CLERCK, K. The effect of temperature and humidity on electrospinning. **Journal of Materials Science**. v. 42, n. 1, p. 261-272, 2009.

HAIDER, A.; HAIDER, S.; KANG, I. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. **Arabian Journal of Chemistry**. v. 11, n. 8, p. 1165-1188, 2018.

HAIDER, S.; AL-ZEGHAYER, Y.; AHMED ALI, F.; HAIDER, A.; MAHMOOD, A.; AL-MASRY, W.; IMRAN, M.; AIJAZ, M. Highly aligned narrow diameter chitosan electrospun nanofibers. Journal of Polymer Research. v. 20 n. 4, p. 1–11, 2013.

LAUDENSLAGER, M. J.; SIGMUND, W. M. **"Electrospinning" Encyclopedia of Nanotechnology**. Springer Publishers. 2012.

LI, W. J.; LAURENCIN, C. T.; CATERSON, E. J.; TUAN, R. S.; KO, F. K. Electrospun nanofibrous struscture: a novel scaffold for tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research**. v. 60, n. 4, p. 613-621, 2002.

MATABOLA, K. P.; MOUTLOALI, R. M. The influence of electrospinning parameters on the morphology and diameter of poly (vinyledene fluoride) nanofibers-effect of sodium chloride. **Journal of Materials Science**. v. 48, p. 5475-5482, 2013.

PILLAY, V.; DOTT, C.; CHOONARA, Y. E.; TYAGI, C.; TOMAR, L.; KUMAR, P.; DU TOIT, L. C.; NDESENDO, V. M. K. A review of the effect of processing variables on the fabrication of electrospun nanofibers for drug delivery applications. **Journal of Nanomaterials**. v. 1, p. 1-22, 2013.

SILL, T. J.; RECUM, H. A. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. **Biomaterials**. v. 29, n. 13, p. 1989-2006, 2008.

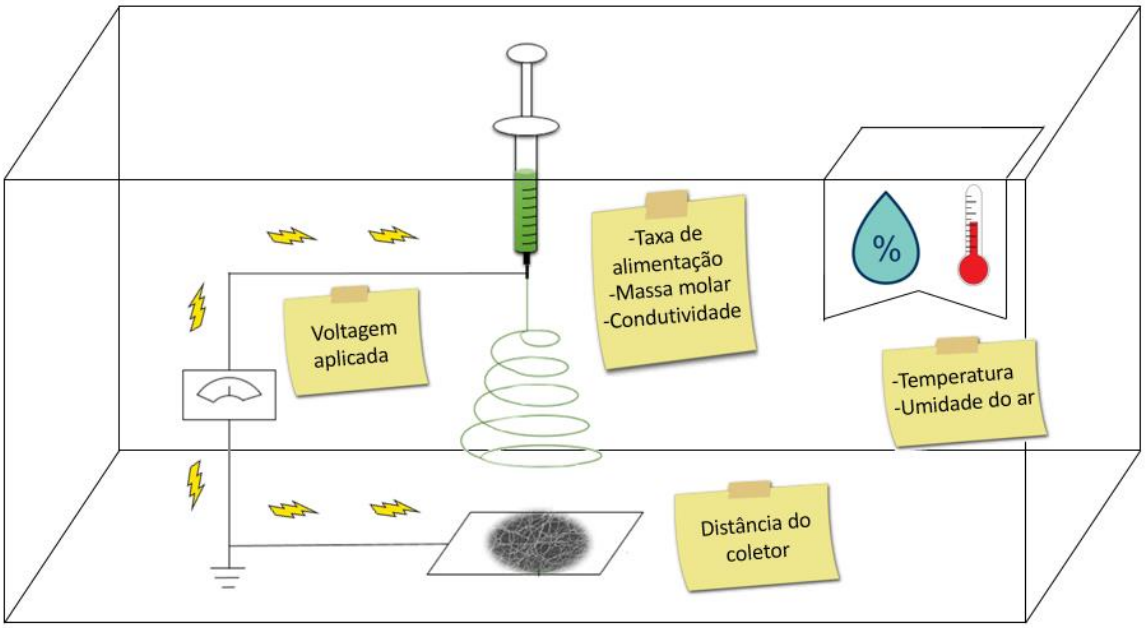
ŠKRLEE, K.; ZUPANĚIĚ, Š.; MIHEVE, S. P.; KOCBEK, P.; KRISTL, J.; BERLEC, A. Development of electrospun nanofibers that enable high loading and long-term viability of probiotics, European **Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 136, p. 108-119, 2019

SUN, B.; LONG, Y. Z.; ZHANG, H. D.; LI, M. M.; DUVAIL, J. L.; JIANG, X. Y.; YIN, H. L. Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electrospinning. **Progress in Polymer Science**. v. 39, n. 5, p. 862-890, 2013.

TEO, W. E.; RAMAKRISHNA, S. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. **Nanotechnology**. v. 17, p. 89-106, 2006.

ZHANG, C.; YUAN, X.; WU, L.; HAN, Y.; SHENG, J. Study on morphology of electrospun poly (vinyl alcohol) mats. **European Polymer Journal**. v. 41, n. 3, p. 423-432, 2005.

GRAPHICAL ABSTRACT



SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS COMPUTACIONAIS EMPREGANDO DFT EM COMPLEXOS DE Cu(II) CONTENDO LIGANTES TRIDENTADOS FENOLATO-IMINA COM GRUPO PENDENTE N-,S- E O-

TAMARA DOS SANTOS MACHADO[1]; DANIELLE TAPIA BUENO[2]; IANKA JACONDINO NUNES[2]; ROBSON DA SILVA OLIBONI[2]; ADRIANA CASTRO PINHEIRO[3]

[1]Universidade Federal de Pelotas – tamara_dsantos@hotmail.com.br
[2]Universidade Federal de Pelotas – danibueno693@gmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas – iankajacondinonunes@gmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas – rooliboni@gmail.com
[3]Universidade Federal de Pelotas – adrianacastropinheiro@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A teoria do funcional da densidade (DFT) é uma teoria de mecânica quântica utilizada para investigar sistemas de muitos corpos, em particular, átomos, moléculas e fase condensada. A DFT tem mostrado ser um dos métodos mais eficientes para cálculos de propriedades eletrônicas e estruturais de atômicos e moléculas (IFTIKHAR, 2018).

Estudos teóricos relacionando a estrutura molecular de uma classe de compostos com as suas respectivas atividades biológicas (determinadas experimentalmente) visam orientar a síntese de novos compostos, de forma a economizar reagentes e otimizar o tempo. As propriedades analisadas para obtenção de um conjunto que se relacione com a atividade biológica são chamadas de descritores. Os descritores mecânicos quânticos ou eletrônicos são obtidos por meio de cálculos quânticos referentes à estrutura eletrônicas das moléculas, como densidade eletrônica, energia e densidade dos orbitais de fronteira.

Desta forma, o presente estudo objetivou a síntese de quatro novos complexos de Cu(II) contendo ligantes tridentados do tipo fenolato-imina. Dados estruturais e eletrônicos dos novos complexos foram determinados por cálculos baseados na teoria do funcional de densidade (DFT) com o objetivo de determinar e caracterizar as estruturas de menor energia, assim como identificar os possíveis fatores eletrônicos e geométricos dos novos complexos, conforme a modificação do ligante. Esses estudos teóricos, irão auxiliar no entendimento das atividades biológicas dos complexos, determinadas experimentalmente.

2. METODOLOGIA

2.1. Síntese dos pré-ligantes (1a-1d): Os pré-ligantes **1a-1b** foram sintetizados seguindo procedimentos descritos na literatura (DE OLIVEIRA, 2018).

2.2. Síntese dos complexos

2.2.1. Síntese do complexo [Cu{Ph(NH)-C_2H_4-(N=CH)-2,4-terc-butil-2-(OC_6H_2)}Cl]) (2a): A uma solução de $CuCl_2.2H_2O$ (0,075 g, 0,44 mmol) em metanol (5 mL), mantida sob agitação constante e a 25ºC, foi adicionada gota a gota uma solução do pré-ligante **1a** (0,200 g, 0,44 mmol) em metanol (10 mL). A

mistura reacional foi deixada por 24h com agitação constante. Ao término do tempo reacional o solvente foi evaporado, e o complexo **2a** foi lavado (3×5 mL) com metanol gelado e seco sob vácuo. O complexo **2a** foi obtido como um sólido de cor verde escuro com rendimento de 79%. IV (ATR, cm^{-1}): υ 1616 (C=N). UV-Vis (CH_2Cl_2, 200 – 700 nm, 25 ºC): 230 (π→π* benzeno), 267 (π→π* imina), 345 (n→π), 415; 462 (L→M) e 620 (d→d).

2.2.2. Síntese do complexo [Cu{C_9H_2N-8-(N=CH)-2,4-terc-butil-2-(OC_6H_2)}Cl] (2b): A rota de síntese é similar a descrita para o complexo **2a**, iniciando com **1b** (0,200 g, 0,55 mmol) e $CuCl_2{\cdot}2H_2O$ (0,094 g, 0,55 mmol). O complexo **2b** foi obtido como um sólido de cor marrom com rendimento de 87%. IV (ATR, cm^{-1}): υ 1600 (C=N). UV-vis (CH_2Cl_2, 200 – 700nm, 25 ºC): 237 (π→π* benzeno), 286 (π→π* imina), 347 (n→π) e 479 (L→M).

2.2.3. Síntese do complexo [Cu{2-PhS-Ph-CH_2-(N=CH)-2,4-terc-butil-2-(OC_6H_2)}Cl] (2c): A rota de síntese é similar a descrita para o complexo **1b** iniciando com **1c** (0,100 g, 0,2mmol) e $CuCl_2{\cdot}2H_2O$ (0,0425g, 0,25mmol). A mistura reacional foi deixada a 40 ºC por 24 h. O complexo **2c** foi obtido como um sólido de cor verde escuro, com rendimento de 67,0%. IV (ATR, cm^{-1}): υ 1623 (C=N). UV-Vis (CH_2Cl_2, 200 – 700 nm, 25 ºC): 234 (π→π* benzeno), 276 (π→π* imina), 365 (n→π), 470 (L→M) e 547; 655 (d→d).

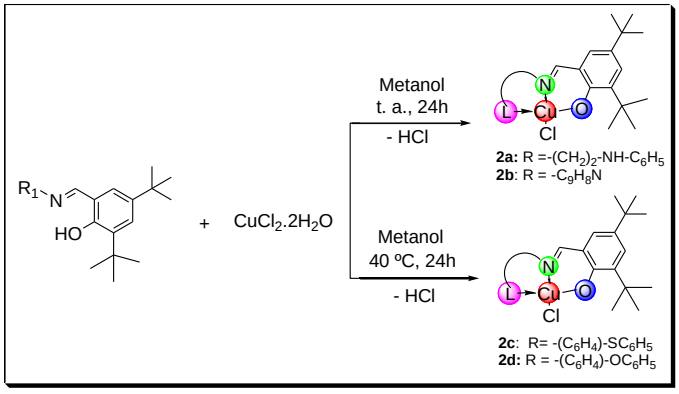
2.2.4. Síntese do complexo [Cu{2-PhO-Ph-(N=CH)-2,4-terc-butil-2-(OC_6H_2)}Cl] (2d): A rota de síntese é similar a descrita para o complexo **2a**, iniciando com **1d** (0,100 g, 0,2 mmol) e $CuCl_2{\cdot}2H_2O$ (0,0425 g, 0,25 mmol). A mistura reacional foi deixada a 40 ºC por 24 h. O complexo **2d** foi obtido como um sólido de cor verde escuro com rendimento de 72,0%. IV (ATR, cm^{-1}): υ 1623 (C=N). UV-vis (CH_2Cl_2, 200 – 700 nm, 25 ºC): 231 (π→π* benzeno), 267 (π→π* imina), 335 (n→π), 455 (L→M) e 592 (d→d).

2.3. Métodos Computacionais: Os complexos de cobre foram desenhados utilizando o software livre Avogadro e suas estruturas pré-otimizadas utilizando o campo de forças UFF (*Universal Force Field*), que estima parâmetros de potencial para cada átomo com base apenas no elemento, sua hibridização e conectividade. A partir das estruturas pré-otimizadas, cálculos de estrutura eletrônica foram realizados com o pacote ORCA, com a teoria do funcional da densidade, utilizando o funcional B3LYP, e as funções de base def2-TZVP para todos os átomos. Todas as estruturas otimizadas foram confirmadas como mínimos da superfície de energia potencial. A aproximação da resolução da identidade RIJCOSX e a correção de dispersão D3BJ foram utilizadas em todos os cálculos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A reação de $CuCl_2.2H_2O$ em quantidade equimolar com **1a-1d** levou a obtenção de 4 novos complexos de Cu(II). Os complexos **2a-2d** foram isolados como sólidos de cor verde escuro ou marrom com bons rendimentos (67-87%) (Esquema 1). A caracterização desses complexos foi estabelecida com base em espectroscopia de IV, UV-Vis e cálculos teóricos empregando a teoria do funcional da densidade (DFT). Estudos computacionais utilizando DFT foram aplicados aos complexos de Cu(II) contendo ligantes tridentados fenolato-imina,

com diferentes grupos pendentes contendo átomo doador S, O ou N, com o objetivo de determinar e caracterizar as estruturas de menor energia, assim como identificar os possíveis fatores eletrônicos e geométricos dos complexos.



Esquema 1. Reação de síntese dos complexos 2a – 2d.

Tais relações matemáticas baseadas em propriedades estruturais, físico-químicas e conformacionais contribuem no entendimento e predição da relação estrutural e eletrônica dos novos complexos com a atividade biológica investigada *in vitro*/*in vivo*.

Os complexos de cobre (II) foram desenhados e pré-otimizados com o auxílio do programa Avogadro, que é um editor e visualizador de moléculas, muito utilizado na química computacional, modelagem molecular e bioinformática. Essa pré-otimização nos fornece um arquivo com as coordenadas cartesianas que é posteriormente usada para os cálculos de DFT utilizando o pacote ORCA 4.0, com o funcional da classe B3LYP e os parâmetros

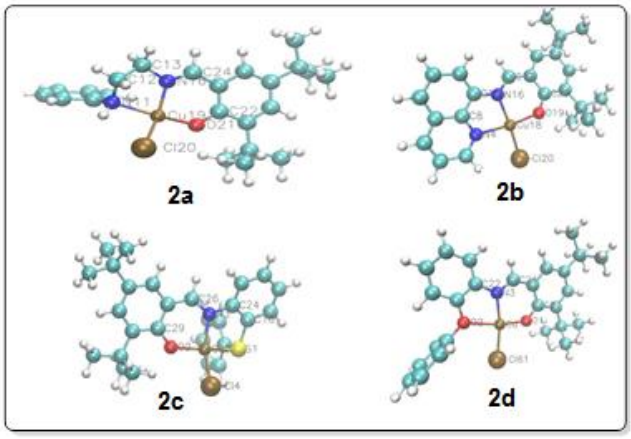


Figura 1 - Estruturas otimizadas para os complexos **2a-2d**.

TightOPT e TightSCF para convergência. As estruturas de mínimo de energia, energias e formas dos orbitais moleculares, foram obtidas a partir dos cálculos de estrutura eletrônica.

Na Figura 1 são apresentadas as estruturas de mínimo de energia para os complexos **2a-2d**. As estruturas otimizadas de todos os complexos apresentam número de coordenação quatro (04), com geometria quadrática, mesmo quando o ambiente de coordenação é alterado, pela presença de

diferentes átomos doadores (N, S e O) em sua esfera de coordenação. Ainda, as distâncias de ligação entre os ligantes e o átomo de Cu(II) apresentam valores próximos a obtidos para sistemas similares. Um maior desvio da geometria quadrática é observado para o **2c**. Ao compararmos as energias dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO observou-se pequenas diferenças, Tabela 1. Análise das energias dos orbitais HOMO de maior energia e LUMO de menor energia, notamos que as energias correspondentes aos complexos 2a e 2b, contendo átomo doador pendente N são maiores quando comparados aos complexos contendo S ou O como átomo doador. Observa-se um padrão para os orbitais moleculares de fronteira dos complexos de Cu(II). Os orbitais moleculares de fronteira HOMO e LUMO mostram que no orbital HOMO há uma maior contribuição do metal Cu(II), com o orbital principalmente deslocalizado no ligante. No LUMO, há pouca contribuição do metal e o orbital encontra-se principalmente localizado no grupo fenolato do ligante. Assim, os orbitais de fronteira dos complexos são bastante semelhantes, apesar das modificações nos ligantes coordenados ao centro metálico.

Tabela 1. Energia dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO (eV) de 2a-2d .

		2a	2b	2c	2d
Spin para cima	LUMO (eV)	-1.7807	-2.7201	-2.3263	-2.3118
	HOMO (eV)	-5.5077	-5.5321	-5.6162	-5.6686
	ΔE (eV)	3.7270	2.812	3.2899	3.3568
Spin para baixo	LUMO (eV)	-2.9767	-2.8289	-3.4070	-3.3291
	HOMO (eV)	-5.4833	-5.4936	-5.5793	-5.6210
	ΔE (eV)	2.5066	2.6647	2.1723	2.2919

4. CONCLUSÕES

Quatro novos complexos tridentados de Cu(II) contendo ligantes fenolato-imina com grupos pendentes doadores N-, O- e S foram sintetizados e caracterizados. Através da Teoria do Funcional da Densidade foi possível determinar e caracterizar as estruturas de menor energia dos complexos, em que as mesmas apresentam geometria quadrática, com pouca variação na esfera de coordenação independente da natureza dos ligantes. A densidade eletrônica dos orbitas de fronteira dos complexos são semelhantes entre si, com pouca participação dos átomos doadores.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

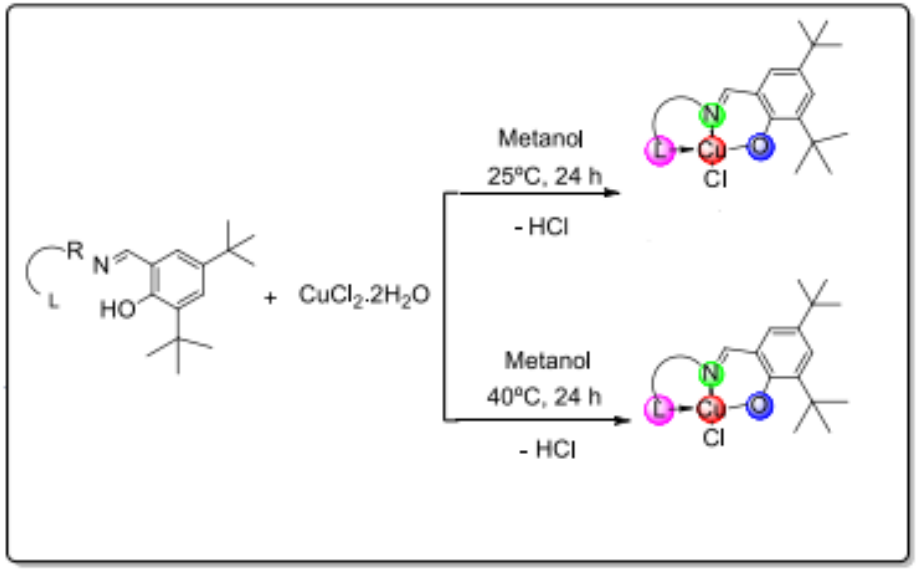
DE OLIVEIRA, L.L.; DA SILVA, S.M.; CASAGRANDE, A.C.A.; STIELER, R. Synthesis and characterization of Ni (II) complexes supported by phenoxy/naphthoxy-imine ligands with pendant N- and O-donor groups and their use in ethylene oligomerization. **Apllied Organometallic Chemistry**, Brazil, v. 32, n. 7, p. 4414-4427, 2018.

IFTIKHAR, B.; JAVED, K.; KHAN, M.S.U.; AKHTER, Z.; MIRZA, B.; MCKEE, V. Synthesis, characterization and biological assay of salicylaldehyde Schiff base Cu(II) complexes and their precursors. Journal of Molecular Structure, Pakistan, v. 1155, p. 337-348, 2018.

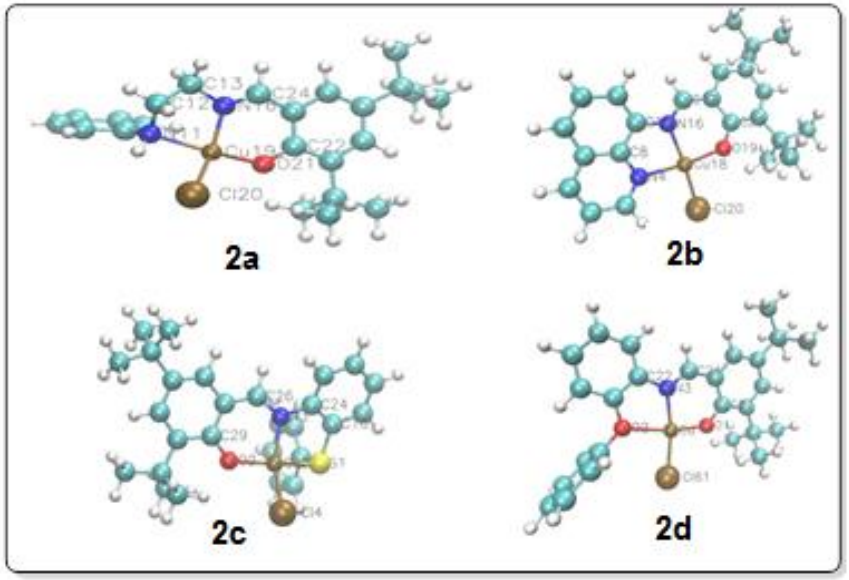
VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS COMPUTACIONAIS EMPREGANDO DFT EM COMPLEXOS DE Cu(II) CONTENDO LIGANTES TRIDENTADOS FENOLATO-IMINA COM GRUPO PENDENTE N-,S- E O-

TAMARA S. MACHADO[1]; DANIELLE T. BUENO[2]; IANKA J. NUNES[2]; ROBSON DA S. OLIBONI[2]; ADRIANA C. PINHEIRO[3]



✓ IV
✓ DFT
✓ UV-Vis



EFEITOS DE UM COMPOSTO ORGÂNICO DE SELÊNIO NO MODELO DA PRIVAÇÃO DO SONO EM CAMUNDONGOS

AIRTON SINOTT[1]; ANA PAULA PESARICO[2]; PALOMA BIRMANN[3], CAROLINE SIGNORINI GOMES[4], EDER JOÃO LENARDÃO[5], LUCIELLI SAVEGNAGO[6]

[1]Universidade Federal de Pelotas – antsinott@gmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas – anappesarico@gmail.com
[3]Universidade Federal de Pelotas – paloma_birmann@hotmail.com
[4]Universidade Federal de Pelotas – carosigomes@gmail.com
[5]Universidade Federal de Pelotas – elenardao@uol.com.br
[6]Universidade Federal de Pelotas – luciellisavegnago@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O 3-(4-clorofenilselanil)-1-metil-1h-indol (CMI) é um composto orgânico de selênio que apresenta diferentes efeitos farmacológicos, como efeito do tipo antidepressivo em diferentes modelos, anticâncer e ansiolítico (BIRMANN *et al.*, 2018; CASARIL *et al.*, 2019; CASARIL *et al.*, 2020). Porém nenhum estudo foi realizado avaliando seu efeito em reverter o comportamento do tipo depressivo em camundongos submetidos a privação do sono.

Irregularidade no ciclo circadiano acompanhado por episódios de privação do sono afetam o metabolismo e a fisiologia celular. Na quarentena da COVID-19, a insônia aumentou entre a população (GIALLONARDO *et al.*, 2020), o que torna esse problema ainda mais emergente. Além disso, a insônia é um dos sintomas dos pacientes que apresentam depressão (MA; SONG; WANG; SHI *et al.*, 2019), o que pode ajudar a desencadear a doença ou mesmo agrava-la.

A depressão é uma doença multifatorial e o estresse, câncer, e alteração no sistema imune, assim como a privação do sono, são todos fatores que contribuem para o aparecimento dessa doença. Entre suas características psicológicas, a anedonia, exaustão mental, irritação e, em casos extremos, suicídio estão presentes em pacientes depressivos (BELMAKER *et al.*, 2008). Para o tratamento da depressão existem diversos fármacos disponíveis, entretanto para muitos pacientes o tratamento não atinge um resultado satisfatório e algumas vezes muitos pacientes param de reagir ao tratamento (IONESCU *et al.*, 2015).

Com tudo descrito e sabendo que a privação do sono é um problema emergente e fator de risco para a depressão, o objetivo deste trabalho é descrever as propriedades do CMI em reverter o comportamento do tipo depressivo em camundongos submetidos a privação do sono.

2. METODOLOGIA

O CMI foi preparado no Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LASOL) da Universidade Federal de Pelotas, de acordo com Vieira et al. (2017). A fluoxetina foi a obtida em meio comercial. O CMI foi dissolvido em óleo de canola, uma substância não polar, e administrada pela via intragástrica (i.g) na dose de 1 mg/kg enquanto a fluoxetina foi dissolvida em salina e administrada pela via i.g na dose de 10 mg/kg.

O estudo utilizou camundongos *Swiss* machos de 4 a 6 semanas. Durante o processo, os animais tinham livre acesso a água e comida e estavam no ciclo de 12h de claro/escuro e mantidos em uma temperatura de 22+-2 °C. Todo o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEA/UFPEL 38156-2019).

Neste protocolo (Fig.1), um grupo de camundongos foi induzido a privação do sono aguda de 24h. A privação era realizada em uma caixa com 3 plataformas e então preenchida com água por 4 cm acima da base. Os camundongos quando chegam na fase do movimento rápido dos olhos (REM) durante o sono relaxam a musculatura fazendo que os mesmos se desequilibrem da plataforma e caiam na água, e em seguida subam novamente nela, impedindo os mesmos de dormir (MISRANI *et al.*, 2019).

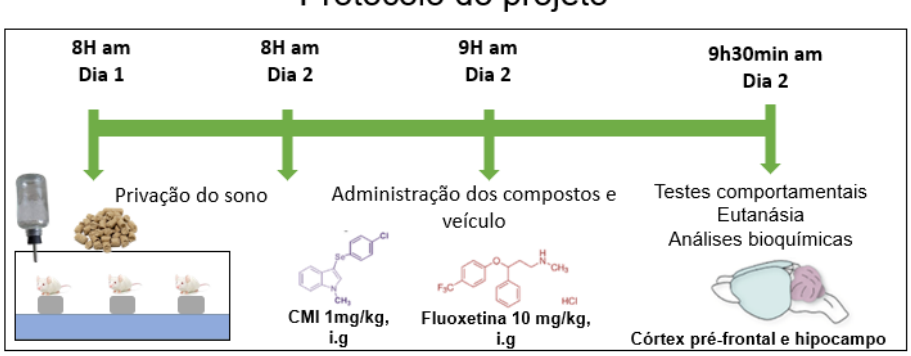


Figura 1. Protocolo utilizado no projeto.

Após 24h, os camundongos foram retirados da privação do sono. Após foi realizada a administração dos veículos (óleo de canola + salina), CMI (1mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) nos camundongos e 30 minutos após os testes comportamentais foram feitos. Os comportamentos para avaliar o efeito tipo antidepressivo do CMI foram: o teste do nado forçado (PORSOLT *et al.*, 1977), que mede a imobilidade do camundongo num período de 4 minutos, dentro de um período total de 6 minutos e o Splash Test (ISINGRINI *et al.*, 2010) que mede o tempo de limpeza durante 5 minutos. Após o comportamento, os camundongos foram eutanasiados e foram realizadas as coleta de duas estruturas: o córtex pré-frontal e o hipocampo. Os testes bioquímicos realizados foram a atividade da Na^+K^+-ATPase (Fiske, et al, 1925) e o nível de espécies reativas ao oxigênio (Loetchutinat, 2005),

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média e considerados significativos quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas pela análise de variância de um ou duas vias seguidas pelo teste de post hoc Tukey através do software GraphPad Prism 7.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais submetidos à privação do sono demonstraram um comportamento do tipo depressivo, uma vez que os animais diminuíram o tempo de limpeza no splash test (Fig. 2A) e aumentaram o tempo de imobilidade no teste do nado forçado (Fig. 2B). O tratamento com CMI foi eficaz em reverter essas alterações, bem como a fluoxetina. A fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina, foi utilizado para validar o teste comportamental.

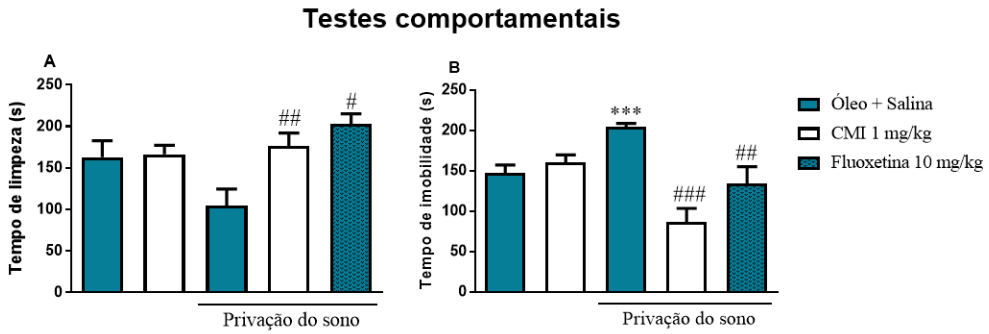


Figura 2. Efeito do tratamento com CMI e fluoxetina (1 e 10 mg/kg, respectivamente, pela via intragástrica) nos testes comportamentais nos camundongos controles ou submetidos a privação do sono. Tempo de limpeza no Splash test (A); Tempo de imobilidade no teste do nado forçado (B). Os resultados estão expressos em média ± erro padrão da média. (n = 7) ** p < 0.01 e *** p <0.001 quando comparados com o controle. # p < 0.05, ## p <0.01 e ### p <0.001 quando comparados com o grupo da privação do sono (two-way Anova para CMI e one-way para fluoxetina seguido pelo teste de Tukey).

Em relação aos testes bioquímicos, o CMI foi efetivo em modular a atividade da Na^+K^+- ATPase no córtex pré-frontal (Fig. 3A), mas não no hipocampo (Fig. 3B), e diminuir o nível de espécies reativas no hipocampo (Fig. D), mas não no córtex pré-frontal (Fig. C) nos animais submetidos a privação do sono. A atuação do CMI no córtex pré-frontal e no hipocampo pode explicar sua propriedade do tipo antidepressiva *in vivo*. Com a diminuição da atividade da Na^+K^+- ATPase, os neurônios mantêm a homeostase do potencial de ação o que permite a maior liberação de neurotransmissores, como serotonina e dopamina, e com a diminuição de espécies reativas há maior integridade em proteínas, enzimas e membranas celulares, o que contribui para manter a estrutura e a manutenção do cérebro, o que pode impedir o comportamento tipo depressivo.

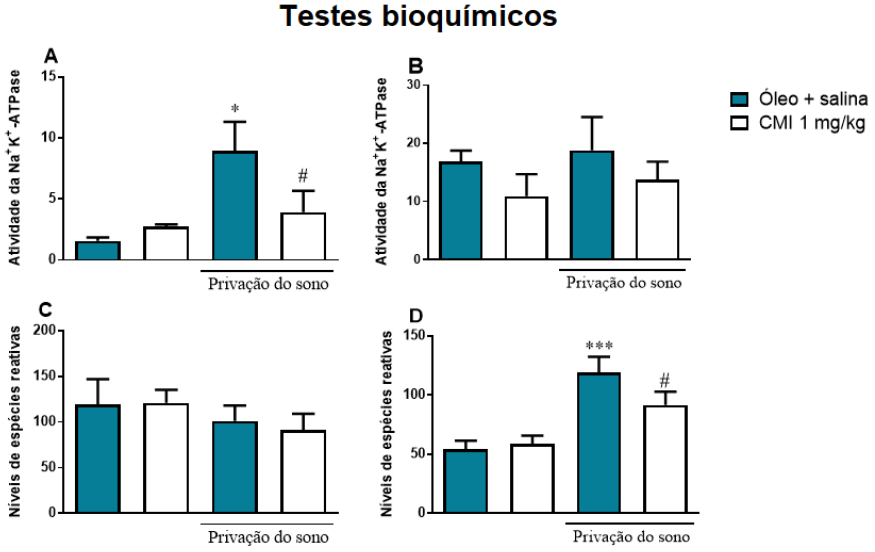


Figura 3. Efeito do tratamento com CMI na atividade da Na^+K^+-ATPase e os níveis de espécies reativas. A atividade da Na^+K^+-ATPase dada em nmol Pi/mg proteína/min, no (a) córtex pré-frontal e (b) hipocampo; Níveis das espécies reativas, dada em unidades de fluorescência, no (c) córtex pré-frontal e (d) hipocampo. Os resultados estão expressos em média ± erro padrão da média.

(n = 7) * p < 0.05 e *** p < 0.001 quando comparados com o controle. # p < 0.05, quando comparado ao grupo da privação do sono (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Tukey).

4. CONCLUSÕES

O tratamento com CMI reverteu o comportamento do tipo depressivo em camundongos submetidos a privação do sono, possivelmente através da modulação da atividade da Na^+K^+, ATPase e pela diminuição dos níveis de espécies reativas. Estudos futuros são necessários para melhor avaliar genes e proteínas expressas e inibidas pelo tratamento com CMI no modelo da privação do sono.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELMAKER, R. H.; AGAM, G. Major depressive disorder. **The New England Journal of Medicine**, 358, n. 1, p. 55-68, Jan 3 2008.

BIRMANN, *et al.* 3-(4-Chlorophenylselanyl)-1-methyl-1H-indole, a new selenium compound elicits an antinociceptive and anti-inflammatory effect in mice. **European Journal of Pharmacology**, 827, p. 71-79, May 15 2018.

CASARIL, A. M.; DOMINGUES, M.; BAMPI, S. R.; DE ANDRADE LOURENCO, D. *et al.* The selenium-containing compound 3-((4-chlorophenyl)selanyl)-1-methyl-1H-indole reverses depressive-like behavior induced by acute restraint stress in mice: modulation of oxido-nitrosative stress and inflammatory pathway. **Psychopharmacology (Berl)**, 236, n. 10, p. 2867-2880, Oct 2019.

CASARIL, A. M.; *et al.* The antioxidant and immunomodulatory compound 3-[(4-chlorophenyl)selanyl]-1-methyl-1H-indole attenuates depression-like behavior and cognitive impairment developed in a mouse model of breast tumor. **Brain Behavior and Immunity**, 84, p. 229-241, Feb 2020.

GIALLONARDO, V.; SAMPOGNA, G.; DEL VECCHIO, V.; LUCIANO, M. *et al.* The Impact of Quarantine and Physical Distancing Following COVID-19 on Mental Health: Study Protocol of a Multicentric Italian Population Trial. **Frontries in Psychiatry**, 11, p. 533, 2020.

IONESCU, D. F.; ROSENBAUM, J. F.; ALPERT, J. E. Pharmacological approaches to the challenge of treatment-resistant depression. **Dialogues in Clinical Neurosciense**, 17, n. 2, p. 111-126, Jun 2015.

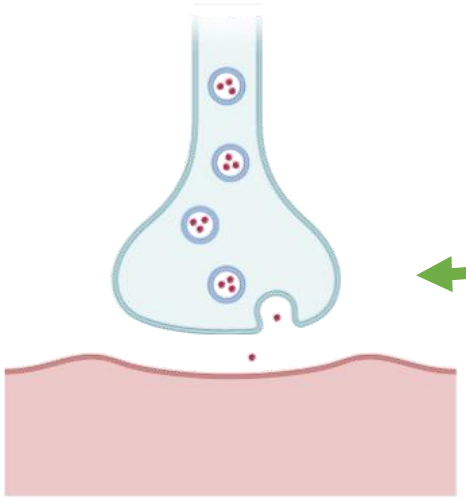
ISINGRINI, E.; *et al.* Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: a model of fluoxetine resistance in mice. **PLoS One**, 5, n. 4, p. e10404, Apr 28 2010.

MA, W.; SONG, J.; WANG, H.; SHI, F. *et al.* Chronic paradoxical sleep deprivation-induced depression-like behavior, energy metabolism and microbial changes in rats. **Life Sciense**, 225, p. 88-97, May 15 2019.

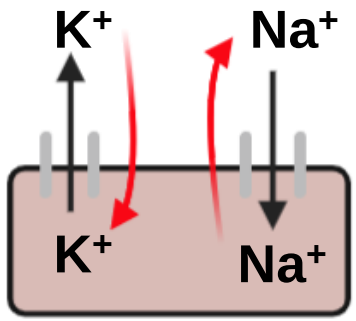
MISRANI, A.; *et al.* Differential effects of citalopram on sleep-deprivation-induced depressive-like behavior and memory impairments in mice. **Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry**, 88, p. 102-111, Jan 10 2019.

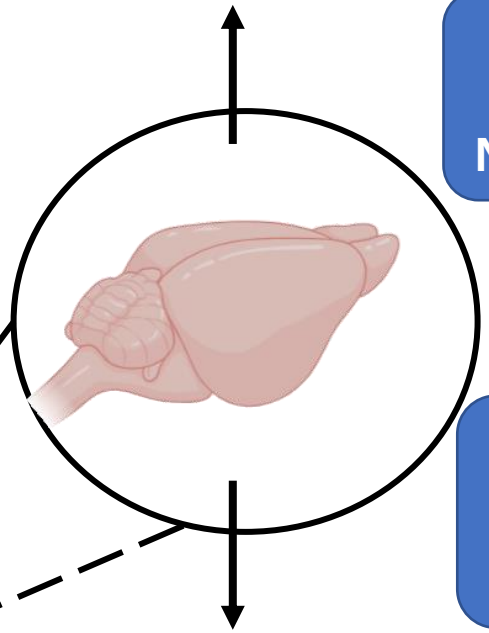
PORSOLT, R. et al. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, 266, n. 5604, p. 730-732, Apr 21 1977.

VIEIRA, B. M. et al. Ultrasound-Assisted Synthesis and Antioxidant Activity of 3-Selanyl-1 H -indole and 3-Selanylimidazo[1,2- a]pyridine Derivatives. **Asian Journal of Organic Chemistry**, [s. l.], v. 6, n. 11, p. 1635–1646, 2017.



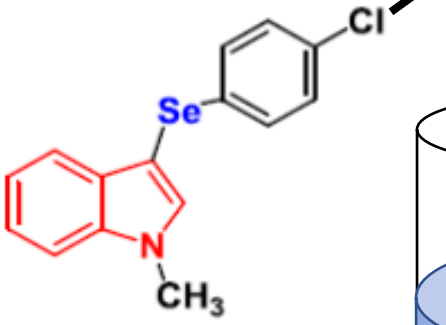
Polarização celular e diminuição da liberação de neurotransmissores





Aumento da atividade da Na^+ K^+ ATPase

Aumento dos níveis de espécies reativas

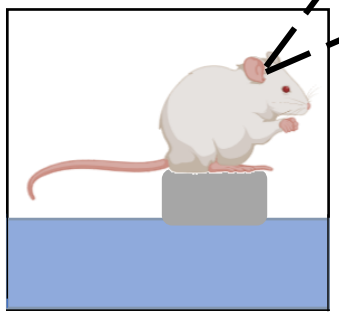


CMI

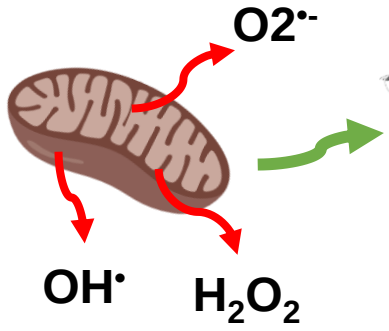
Aumento no tempo de limpeza e diminuição de imobilidade no nado forçado

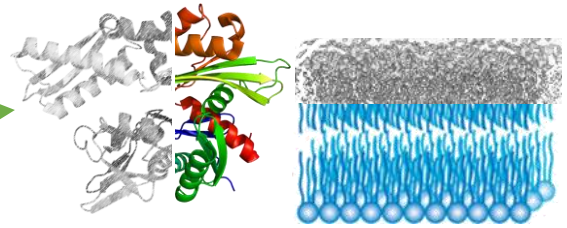


Diminuição no comportamento do tipo depressivo



24H de privação do sono





Degradação de proteínas e lipídios

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE NOVOS COMPLEXOS DE COBRE (II) CONTENDO LIGANTES BASES DE SHIFF

DANIELLE TAPIA BUENO[1]; TAMARA S. MACHADO[2]; IANKA J. NUNES[2]; CAROLINA C. MARTINS[2]; ETHEL A. WILHELM[2]; ADRIANA C. PINHEIRO[3].

[1]Universidade Federal de Pelotas – danibueno693@gmai.com
[2]Universidade Federal de Pelotas – tamara_dsantos@hotmail.com.br
[2]Universidade Federal de Pelotas – iankajacondinonunes@gmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas – carol_cristovao@hotmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas – ethelwilhelm@yahoo.com.br
[3]Universidade Federal de Pelotas – adrianacastropinheiro@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Espécies reativas de oxigênio são produzidas no organismo por metabolismos celulares comuns ao mesmo. Em baixas concentrações estas exercem papel importante no organismo, porém em altas concentrações podem acabar sendo prejudiciais podendo levar a modificações de componentes celulares como lipídeos e proteínas. A alteração no equilíbrio entre espécies oxidantes/antioxidantes no organismo é chamada de estresse oxidativo. Este leva a danos celulares e diversas problemas de saúde como câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas.

A primeira linha de defesa contra os danos causados pelo estresse oxidativo são os antioxidantes. Antioxidantes são definidos como substâncias capazes de prevenir ou reparar os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio. (HALLIWELL, B. et all. 1999 e TACHAKITTIRUNGROD, S. et all. 2007) Antioxidantes sintéticos são amplamente utilizados e recebem muita atenção do ponto de vista farmacêutico, porque são eficazes e de menor custo quando comparado aos antioxidantes naturais.

Compostos de coordenação com atividades antioxidantes demonstram capacidade de proteger os sistemas e as células vivas do comprometimento causado pelo estresse oxidativo ou pelos radicais livres. Esses complexos são geralmente doadores de hidrogênio ou de elétrons para o local reativo na neutralização.

Considerando a importância desse tema na área de saúde, nosso grupo de pesquisa tem se concentrado no desenvolvimento de novos compostos de coordenação, contendo metais bioessenciais, e a investigação da atividade antioxidante desses novos complexos. Recentemente, descrevemos a síntese de uma nova classe de complexos bimetálicos de Cu(II) contendo ligantes Bases de Schiff (Machado, T. et all. 2020). A Atividade antioxidante e a citotoxicidade dos novos complexos foi avaliada por ensaios *in vitro.* Os complexos bimetálicos apresentaram boa atividade na eliminação do radical DPPH. Ainda, a maioria dos complexos de Cu(II) mostrou atividade de eliminação de radicais $ABTS^{+}$. Esses complexos apresentaram baixa citotoxicidade em células V79.

No presente trabalho, ampliamos essa classe de complexos de Cu(II) contendo ligantes Bases de Schiff. A síntese, caracterização e avaliação da atividade antioxidante de novos complexos monometálicos são descritos.

2. METODOLOGIA

2.1.Sintese e caracterização dos pré-ligantes e novos complexos de Cu(II): Os pré-ligantes L1 – L4 foram sintetizados seguindo procedimentos descritos na literatura (CASAGRANDE, 2018). A síntese ocorre via uma reação de condensação da base de Schiff entre uma amina primária e o 3,5-di-tert-butil-2-hidroxibenzaldeído em refluxo por 24h. Os complexos Cu1 – Cu4 foram sintetizados seguindo procedimentos descritos na literatura (MACHADO, T.S., et all, 2020). A reação entre os pré-ligantes L1 – L4 com 1 equiv. de $CuCl_2.2H_2O$ em metanol, à temperatura ambiente para (L1 e L2) ou utilizando 40ºC para (L3 e L4) levou a formação dos complexos (Cu1 – Cu4).

2.2. Ensaio de atividade de eliminação do radical 2,2'-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH): A análise antioxidante dos compostos, foi realizada em colaboração com o Laboratório de Pesquisa em Farmacologia Bioquímica (LaFarBio). Para este ensaio, foram utilizadas diferentes concentrações dos complexos (1, 5, 10, 50, 100 e 200 µM) e uma alíquota dos mesmos foi misturada a uma solução etanólica de DPPH, a qual foi incubada por 30 minutos, a temperatura ambiente, na ausência de luz. Após, a reação de cor é medida em um espectrofotômetro a 517 nm, e os resultados foram expressos como porcentagem (%) do controle.

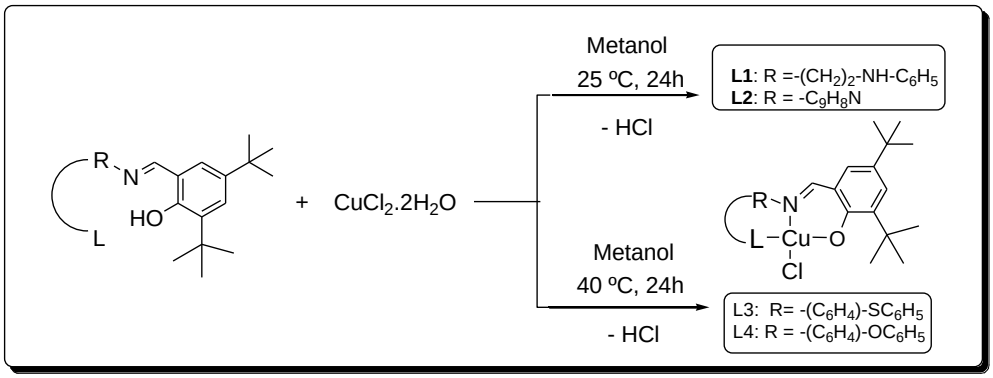
O ácido ascórbico nas mesmas concentrações dos complexos foi usado como controle positivo para determinar a diminuição máxima na absorbância do DPPH.

2.3. Ensaio da atividade de eliminação do radical 2,2'-azino-bis (ácido 3-tilbenztiazolina-6-sulfônico) (ABTS+): Para este ensaio, foram utilizadas diferentes concentrações dos complexos (1, 5, 10, 50, 100 e 200 µM), e uma alíquota dos mesmos foi misturada a uma solução de ABTS diluída numa solução salina tampão fosfato pH 7,4 então foi incubado por 30 minutos a temperatura ambiente na ausência de luz. Após, a reação de cor é medida em um espectrofotômetro a 730 nm e os resultados foram expressos como porcentagem (%) do controle. Foi utilizado o ácido ascórbico como controle positivo para esse ensaio.

2.4. Análise Estatística: Os resultados experimentais foram expressos como a média ± erro padrão da média. Os dados dos ensaios *in vitro* foram analisados por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste de múltiplas faixas de Newman-Keuls, quando apropriado. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando os valores de probabilidade foram menores que 0,05 ($P < 0,05$). Os valores de IC_{50} foram obtidos a partir do gráfico da concentração do composto versus a porcentagem do efeito de eliminação de radicais livres.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A rota geral de síntese para os novos complexos de Cu(II) a partir dos pré-ligantes é apresentada no esquema 1. Os complexos sintetizados, foram isolados com bons rendimentos (67 – 87%) e são estáveis a ar e umidade. As estruturas foram deduzidas com base em espectroscopia na região do infravermelho, espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta/visível e utilizando a teoria do funcional da densidade.



Esquema 1. Rota geral de síntese dos complexos de cobre (II) Cu1 - Cu4.

Para investigar as propriedades antioxidantes de todos os complexos de Cu(II) obtidos, foram realizados métodos espectrofotométricos para a determinação de compostos eliminadores de radicais livres, incluindo os testes $ABTS^+$ e DPPH. O ácido ascórbico, um agente antioxidante amplamente conhecido, foi usado como controle positivo.

O ensaio DPPH foi realizado para determinar a capacidade dos compostos em doar um elétron ou um átomo de hidrogênio. Nesse ensaio, a mudança de coloração da solução etanólica do DPPH de roxo escuro para amarelo indica o efeito de eliminação de radicais livres dos compostos. Os complexos Cu1, Cu3 e Cu4 foram capazes de eliminar o radial DPPH a partir da concentração de 10 µM. Para esses complexos, foi possível observar que conforme aumenta a concentração dos mesmos a porcentagem de eliminação varia, mostrando assim que estes não são dose dependentes.

Tabela 1. Atividade dos complexos de Cu (II) na eliminação de radicais DPPH.

	Complexos Cu (II)				
	Cu1	Cu2	Cu3	Cu4	Ácido ascórbico
Imax(%)	86,1 ± 1,38	[a]	91,9 ± 1,09	81,0 ± 2,55	87,5 ± 6,67
IC_{50}(µM)	6,3	[a]	7,4	6,4	17,0

Imax= % de inibição máxima; IC_{50}= concentração (µM) para reduzir de 50% de $DPPH^+$ formação de radicais; [a]= inativo a 200µM (concentração mais alta testada).

Nesse ensaio os complexos Cu1, Cu3 e Cu4 apresentaram atividade antioxidante superior ao ácido ascórbico, conforme Tabela 1. Os valores de IC_{50} foram de 6,3, 7,4, 6,4 e 17,0 µM para Cu1, Cu3, Cu4 e o ácido ascórbico, respectivamente. O composto Cu3 apresentou o mais alto valor de Imax 91,9%. O complexo Cu2 nas concentrações testadas não apresentou diferença significativa quando comparado ao controle, mostrando assim a sua incapacidade antioxidante neste ensaio.

A atividade antioxidante dos complexos, ainda foi avaliada utilizando o ensaio de atividade da eliminação do radical $ABTS^+$. O complexo Cu1 foi capaz de eliminar o radical ABTS a partir da concentração de 10 µM e apresentou atividade semelhante ao do ácido ascórbico. Os complexos Cu2 – Cu4 nas concentrações testadas não apresentaram diferença significativa quando comparado ao controle, mostrando assim a sua incapacidade antioxidante nesse ensaio.

Tabela 2. Atividade dos complexos de Cu (II) na eliminação de radicais $ABTS^{+}$.

	Complexos Cu (II)				
	Cu1	Cu2	Cu3	Cu4	Ácido ascórbico
Imax(%)	87,7 ± 0,42	a	a	a	99,9 ±0,05
IC_{50}(µM)	11,8	a	a	a	10,8

Imax= % de inibição máxima; IC_{50}= concentração (µM) para reduzir de 50% de $DPPH^{+}$ formação de radicais; [a]= inativo a 200µM (concentração mais alta testada).

4. CONCLUSÕES

Novos complexos de cobre (II) contendo ligantes bases de Shiff tridentados, com grupos pendentes doadores N, S e O foram sintetizados e caracterizados. Os complexos Cu1, Cu3 e Cu4, nas condições empregadas nos ensaios *in vitro*, apresentaram capacidade de eliminação do radical DPPH, com valores de IC_{50} superiores ao do ácido ascórbico, um antioxidante natural. O composto Cu1 se destacou mostrando atividade semelhante ao do ácido ascórbico no ensaio de eliminação do radical $ABTS^{+}$. Como perspectivas futuras pretendemos ampliar os estudos na parte de análise da capacidade antioxidante desses complexos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HALLIWELL, B. GUTTERIDGE, JMC. **Free Radicals in Biology and Medicine**. EUA: Oxford University Press, 1999.

TACHAKITTIRUNGROD, S. OKONOGI, S. CHOWWANAPOONPOHN, S. Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. **Food Chemistry**, Tailândia, v. 103, p. 381 – 388, 2007.

DE OLIVEIRA, L.L; DA SILVA. S.M.; CASAGRANDE, A.C.A.; Stieler, R. Synthesis and characterization of Ni (II) complexes supported by phenoxy/naphthoxy-imine ligands with pendant N- and O-donor groups and their use in ethylene oligomerization. **Applied Organometallicc Chemistry**, v. 32, p. 4414 - 4427, 2018.

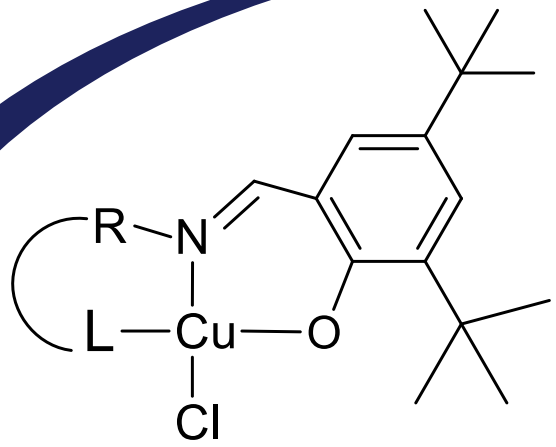
MACHADO, T.S., BUENO, D.T., NUNES, I.J., OLIBONI, R.S., PINHEIRO, A.C. Síntese, caracterização e estudos computacionais empregando DFT em complexos de Cu (II) contendo ligantes bases de Schiff. **VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA**. Pelotas, 2020.

MACHADO, T.S., MATINS, C.C., BUENO, D.T., NUNES, I.J., BUSATTO, F.F., CARGNELUTTI, R., LUCHESE, C., CASAGRANDE, A.C.A., SAFFI, J., WILHELM, E.A., PINHEIRO, A.C. Synthesis, molecular structure and antioxidant activity of bis [L(μ_2-chloro)copper(II)] supported by phenoxy/naphthoxy–imine ligands. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 210, p. 111130, 2020.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE NOVOS COMPLEXOS DE COBRE (II) CONTENDO LIGANTES BASES DE SHIFF

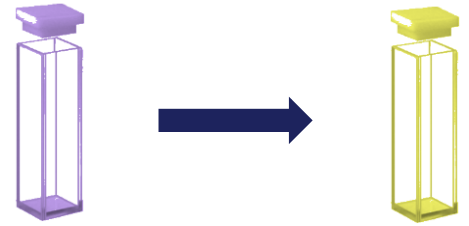
DANIELLE TAPIA BUENO[1]; TAMARA S. MACHADO[2]; IANKA J. NUNES[2];
CAROLINA C. MARTINS[2]; ETHEL A. WILHELM[2]; ADRIANA C. PINHEIRO[3]



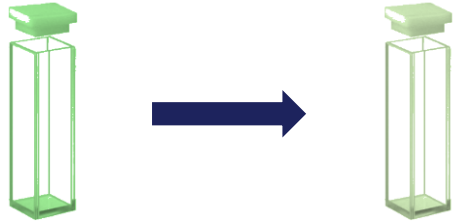
L1: R =-$(CH_2)_2$-NH-C_6H_5
L2: R = -C_9H_8N
L3: R= -(C_6H_4)-SC_6H_5
L4: R = -(C_6H_4)-OC_6H_5

- Compostos de coordenação
- Com atividade antioxidante
- Contendo ligantes
- Bases de Schiff
- Cobre como metal central

Atividade antioxidante



Ensaio da eliminação do radical **DPPH**



Ensaio da eliminação do radical **$ABTS^+$**

INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO DO TIPO ANTIDEPRESSIVA E DE PARAMÊTROS DE TOXICIDADE SISTÊMICA EM CAMUNDONGOS FÊMEAS EXPOSTOS À ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE 2-FENIL-3-(FENILSELANIL)BENZOFURANO

DIANER NORNBERG STRELOW[1]; ESTELA HARTWIG RIBEIRO[2]; LETÍCIA DEVANTIER KRÜGER[2]; TAÍS DA SILVA TEIXEIRA RECH[2]; CÉSAR AUGUSTO BRÜNING[2]; CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO[3]

[1,2,3]Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular – strelowdianer@gmail.com; estelaheufpel@gmail.com; leticiadevantier@hotmail.com; taisteixeira.r@gmail.com, cabruning@yahoo.com.br; cbortolatto@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O transtorno depressivo maior é uma das mais relevantes doenças psiquiátricas que afetam a qualidade de vida dos indivíduos. Além de estimativas apontarem que mais de 300 milhões de pessoas no mundo convivem com esta patologia, o número de pacientes com transtornos mentais apresenta-se em contínuo crescimento, o que torna a depressão uma das maiores prioridades da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2017). Entretanto, a farmacoterapia disponível apresenta inúmeras limitações, como resposta lenta ao tratamento, ineficácia em alguns pacientes e efeitos adversos (HILLHOUSE et al., 2015).

A experimentação animal é uma ferramenta importante para a investigação de novas drogas com possíveis ações terapêuticas. A avaliação do comportamento do tipo depressivo em animais usualmente baseia-se na observação destes quando submetidos a uma situação inescapável e que, após tentativas de fuga, adotam um estado de imobilidade (SLATTERY et al., 2014). A avaliação experimental de potenciais fármacos antidepressivos em fêmeas é essencial visto que a depressão apresenta maior incidência em mulheres (HASIN et al., 2018).

Dentre as alternativas terapêuticas estudadas estão os compostos à base de selênio (WANG et al., 2018). O núcleo benzofurano também é alvo de pesquisas para o tratamento de doenças do sistema nervoso central, como a depressão (RIZZO et al., 2008). Nosso grupo de pesquisa tem investigado o composto 2-fenil-3-(fenilselanil)benzofurano (SeBZF**1**), o qual apresentou atividade antioxidante *in vitro* e efeito do tipo antidepressivo em camundongos machos mediado pelo sistema serotoninérgico. Assim, os objetivos deste estudo foram investigar o efeito do tipo antidepressivo do SeBZF**1** no teste de suspensão pela cauda (TSC) e avaliar o potencial de toxicidade aguda do composto, ambos em camundongos fêmeas.

2. METODOLOGIA

2.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas Swiss, pesando entre 25-35g. O projeto foi cadastrado no COCEPE sob o código 8784 e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEA/UFPel 4897-2017).

2.2 Composto

O composto SeBZF**1** (Figura 1) foi sintetizado no Laboratório de Síntese de Derivados de Selênio e Telúrio (LabSelen) da Universidade Federal de Santa

Catarina. O SeBZF**1** foi dissolvido em óleo de canola e administrado intragastricamente (i.g.) em um volume fixo de 10 ml/kg de peso corporal.

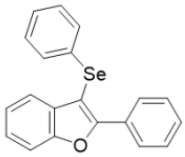


Figura 1. Estrutura química do composto SeBZF**1**

2.3 Procedimentos experimentais

2.3.1 Curva dose-resposta

O composto SeBZF**1** (5 e 50 mg/kg, i.g.) ou seu veículo (óleo de canola) foram administrados 30 minutos antes do TSC. A bupropiona (10 mg/kg, i.g.) foi utilizada como controle positivo. No TSC os camundongos foram submetidos individualmente à suspensão pela cauda durante 6 minutos. Foram avaliados o tempo de latência para o primeiro episódio de imobilidade e o tempo total de imobilidade (STERU et al.,1985). Imediatamente antes do TSC foi realizado o teste do campo aberto (TCA) para avaliar a atividade locomotora (número de cruzamentos entre os quadrantes) e exploratória (número de levantamentos sobre as patas posteriores) durante 4 minutos (WALSH e CUMMINS, 1976).

2.3.2 Avaliação da toxicidade aguda

A toxicidade aguda do composto foi avaliada seguindo as Diretrizes da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE, 2001). Os animais receberam o tratamento com SeBZF**1** (300 mg/kg, i.g.) ou seu veículo (óleo de canola) e foram observados em um período de 14 dias quanto a sinais gerais de toxicidade. No último dia foi realizado o TCA e o ganho de peso corporal foi registrado. A seguir, os animais foram anestesiados com isoflurano e o sangue heparinizado foi coletado por punção cardíaca. O plasma foi utilizado para avaliar as atividades de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) (testes de função hepática) e níveis de uréia plasmática (teste de função renal).

2.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo software GraphPad Prism versão 8.2.0, sendo aplicado o teste D'Agostino Pearson Omnibus para testar a normalidade dos dados. As comparações entre os grupos experimentais foram realizadas através da análise de variância ANOVA de uma via seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett. Quando apenas dois grupos foram estatisticamente comparados foi escolhido um teste t não pareado para a análise dos dados. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M), sendo valores de $p < 0,05$ considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Curva dose-resposta

Os resultados obtidos pelo tratamento agudo de SeBZF**1** estão demonstrados na Figura 2. A análise estatística revelou um efeito significativo do composto na dose de 50 mg/kg na redução no tempo total de imobilidade (Fig. 2A) [$F_{(3, 28)}$= 9,915, p =

0,0001] e o aumento da latência para o primeiro episódio de imobilidade (Fig. 2B) [$F_{(3, 28)}$= 11,62, p < 0,0001]. Dessa forma, foi evidenciado que o SeBZF**1** na dose de 50 mg/kg promoveu um efeito do tipo antidepressivo no TSC, porém não na dose de 5 mg/kg. A bupropiona, como esperado, também causou o aumento do tempo de latência (p < 0,0001) e a redução do tempo total de imobilidade (p = 0,0006).

A administração de SeBZF**1** (5 e 50 mg/kg, i.g.) não alterou a atividade locomotora (Fig. 3A) e exploratória (Fig. 3B) dos animais submetidos ao TCA. Por outro lado, o controle positivo bupropiona (10 mg/kg, i.g.) causou um aumento do número de cruzamentos (p = 0,0334).

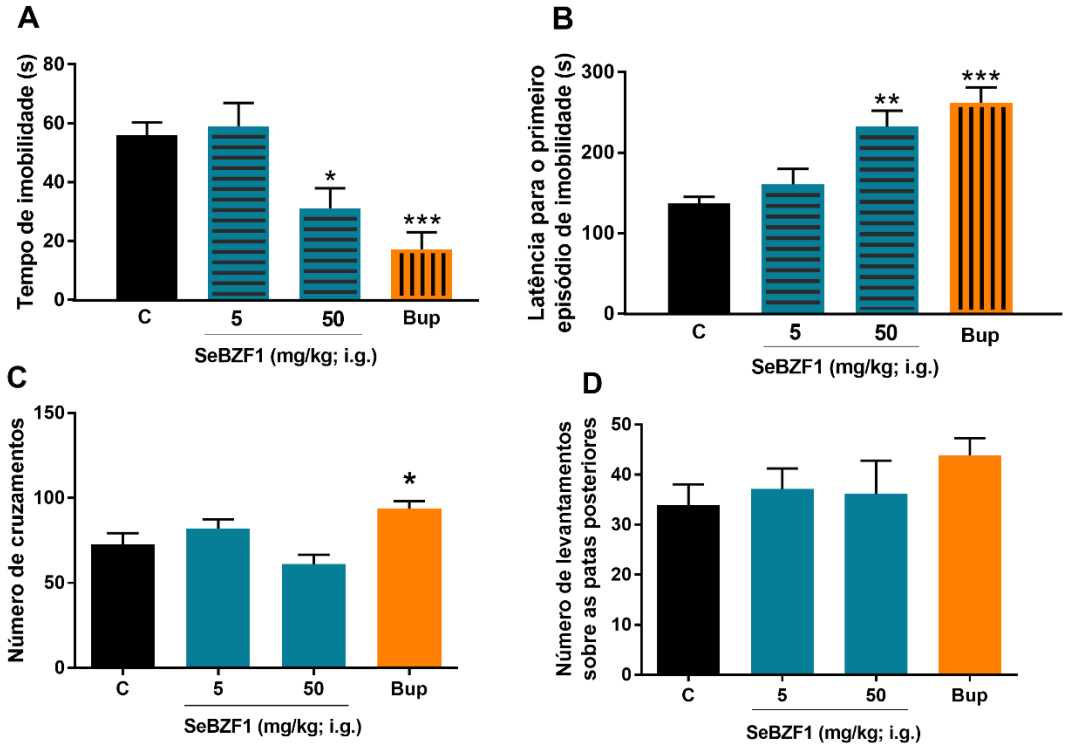


Figura 2. Efeitos do tratamento agudo com SeBZF**1** (5 e 50 mg/kg, i.g.) e bupropiona (10 mg/kg, i.g.) em camundongos fêmeas submetidas ao TSC e TCA. (2A) Tempo total de imobilidade (s); (2B) tempo de latência para o primeiro episódio de imobilidade (s); (2C) Número de cruzamentos; (2D) Número de de levantamentos sobre as patas posteriores. Valores expressos como média ± E.P.M (n = 8 animais/grupo). * p < 0,05, ** p < 0,001 e *** p < 0,0001 comparado ao grupo controle (C). ANOVA de uma via/Dunnett.

3.2 Avaliação da toxicidade aguda

A administração aguda de SeBZF**1** (300 mg/kg, i.g.) em camundongos fêmeas não causou sinais de toxicidade nos parâmetros analisados, como pode ser observado na Figura 4. Os animais submetidos ao tratamento com o composto apresentaram porcentagem de peso corporal (p = 0,5798), consumo alimentar (p = 0,5791), e atividade locomotora (p = 0,5543) e exploratória (p = 0,5446) sem alterações significativas em comparação ao grupo controle. Além disso, a análise dos parâmetros bioquímicos revelou que o grupo submetido ao tratamento com o composto apresentou atividade da AST (p = 0,3333), atividade da ALT (p = 0,7606), e nível de ureia plasmática (p = 0,9519) semelhantes ao do grupo controle.

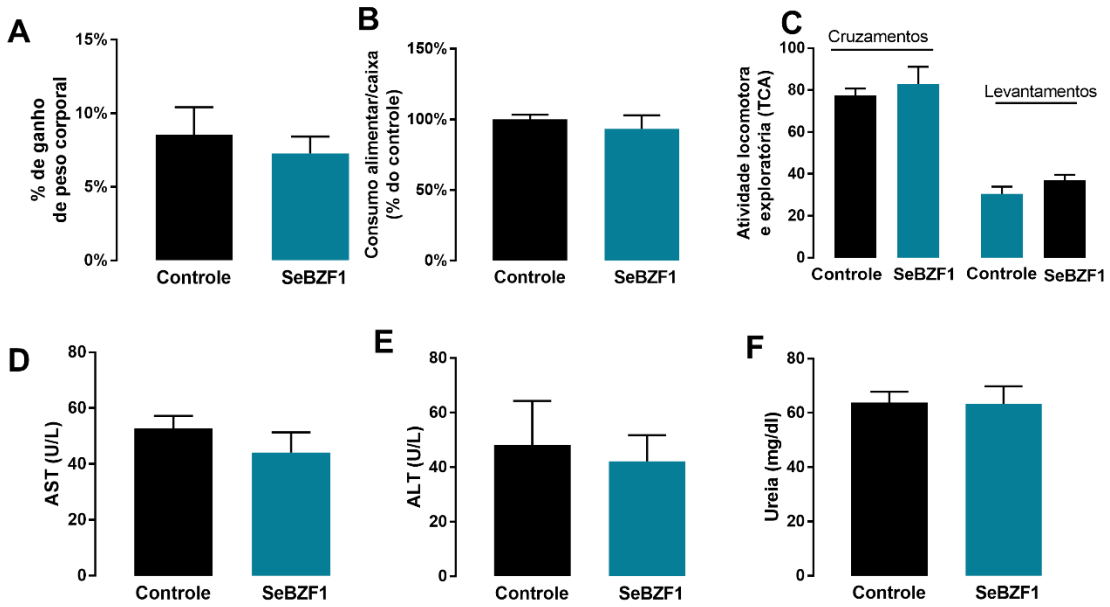


Figura 4. Parâmetros de toxicidade sistêmica em camundongos fêmeas expostos à administração aguda de SeBZF**1** (300 mg/kg, i.g.). Valores expressos como média ± E.P.M (n = 6 animais/grupo). Teste t não pareado.

4. CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos, pode-se concluir que o SeBZF**1**, administrado de forma aguda, apresenta uma ação do tipo antidepressiva em camundongos fêmeas submetidas ao TSC, sem alterar o padrão locomotor. Além disso, os resultados evidenciaram uma segurança ao tratamento agudo com o composto, sem originar sinais de toxicidade nos animais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HASIN, D. S. et al. Epidemiology of Adult DSM-5 Major Depressive Disorder and Its Specifiers in the United States. **JAMA Psychiatry**, v. 75, n. 4, p. 336-46, 2018.

HILLHOUSE, T. M.; J. H. PORTER. A brief history of the development of antidepressant drugs: from monoamines to glutamate. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, v. 23, n. 1, p. 1-21, 2015.

RIZZO, S. et al. Benzofuran-based hybrid compounds for the inhibition of cholinesterase activity, beta amyloid aggregation, and abeta neurotoxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2883-2886, 2008.

SLATTERY, D. A.; CRYAN, J. F. The ups and downs of modelling mood disorders in rodents. **ILAR Journal**, v. 55, n. 2, p. 297-309, 2014.

STERU, L. et al. The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, n.3, p.367–370, 1985.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The Open-Field test: a critical review. **Psychological Bulletin**, Brisbane, v. 83, n. 3, p. 482-504, 1976.

WANG, J.; UM, P.; DICKERMAN, B. A.; LIU, J. Zinc, magnesium, selenium and depression: a review of the evidence, potential mechanisms and implications. **Nutrients**, v. 10, n. 5, p. 1-19, 2018.

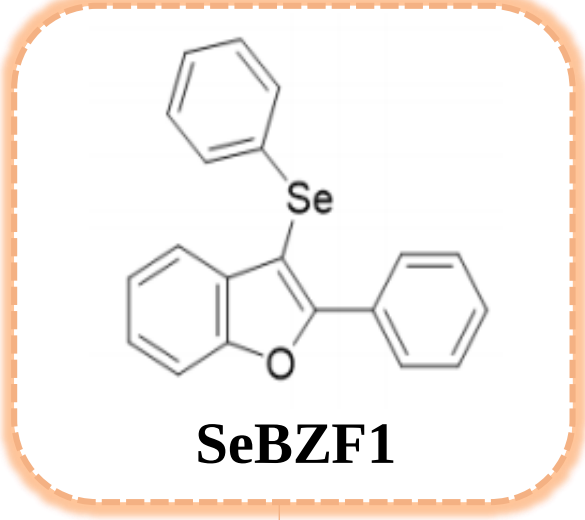
VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO DO TIPO ANTIDEPRESSIVA E DE PARAMÊTROS DE TOXICIDADE SISTÊMICA EM CAMUNDONGOS FÊMEAS EXPOSTOS À ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE 2-FENIL-3-(FENILSELANIL)BENZOFURANO

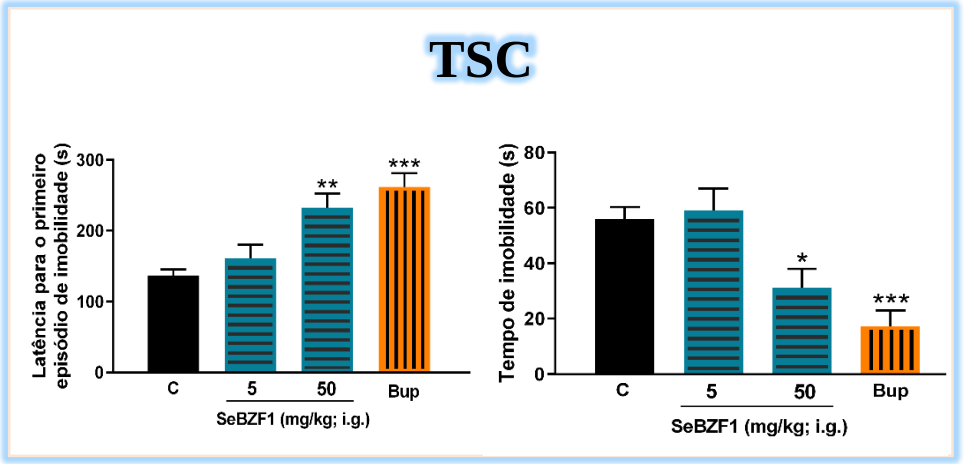
DIANER NORNBERG STRELOW[1]; ESTELA HARTWIG RIBEIRO[2]; LETÍCIA DEVANTIER KRÜGER[2]; TAÍS DA SILVA TEIXEIRA RECH[2]; CÉSAR AUGUSTO BRÜNING[2]; CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO[3]

Ação do tipo antidepressiva

Sem sinais de toxicidade



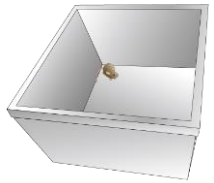
SeBZF1



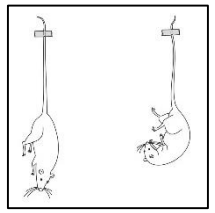
TCA
Consumo alimentar
Ganho de peso corporal
Parâmetros bioquímicos

300 mg/kg, i.g.

5 e 50 mg/kg, i.g.



TCA



TSC

O ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS $D_{2/3}$ NO EFEITO DO TIPO ANTIDEPRESSIVO DA BENZAMIDA N-(3-(FENILSELENIL)PROP-2-IN-1-ÍLICA (SePB) EM CAMUNDONGOS

EVELYN MIANES BESCKOW[1]; GUSTAVO D'AVILA NUNES[1]; ÉVERTON BERWANGER BALBOM[2]; BENHUR GODOI[2]; CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO[1]; CÉSAR AUGUSTO BRÜNING[1].

[1]Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM), Universidade Federal de Pelotas – evy591@gmail.com; cabruning@yahoo.com.br.
[2] Núcleo de Síntese, Aplicação e Análise de Compostos Orgânicos e Inorgânicos (NUSAACOI), Universidade Federal da Fronteira Sul.

1. INTRODUÇÃO

O transtorno depressivo maior (TDM) é uma desordem caracterizada por episódios recorrentes de sintomas depressivos, além de ser etiologicamente complexa e heterogênea. As manifestações mais frequentes incluem anedonia, sonolência excessiva diurna e culpa intensificada, podendo causar grande impacto na qualidade de vida dos indivíduos por serem incapacitantes (MALHI *et al.*, 2018).

O TDM já atinge mais de 350 milhões de pessoas em todo o mundo (MALHI *et al.*, 2018). Além disso, devido ao contexto atual de instalação da epidemia do coronavírus de 2019 (COVID-19), alguns estudos já relatam um aumento de sintomas depressivos em diversas partes do mundo (PENG *et al.*, 2020; TORALES *et al.*, 2020), o que pode resultar em uma maior prevalência da doença no futuro.

Apesar do elevado número de casos de TDM, a fisiopatologia desta doença ainda não é totalmente compreendida (MALHI *et al.*, 2018). Entretanto, o déficit de neurotransmissores do sistema monoaminérgico — como serotonina (5-HT), noradrenalina (NOR) e dopamina (DA) — tem sido proposto como o principal mecanismo etiológico da depressão, além de demonstrar eficácia clínica ao longo dos anos (PLETSCHER, 1991). Porém, o desenvolvimento de resistência aos tratamentos a longo prazo é cada vez mais frequente (AKIL *et al.*, 2018), o que demonstra a necessidade de buscar novas terapias farmacológicas para esta patologia.

Na busca por fármacos inovadores com efeitos antidepressivos, os compostos orgânicos contendo selênio vêm se destacando ao demonstrarem promissoras ações do tipo antidepressivas em testes pré-clínicos realizados em camundongos (BESCKOW *et al.*, 2020; SAMPAIO *et al.*, 2020). Um destes compostos é a benzamida *N*-3-(fenilselenil)prop-2-in-1-ílica (SePB) (**Fig.1**).

A SePB demonstrou possuir uma ação do tipo antidepressiva e esse efeito farmacológico parece depender, em alguma instância, do sistema serotoninérgico (BESCKOW *et al.*, 2020). Com o objetivo de compreender melhor o mecanismo de ação de SePB, no presente trabalho avaliamos se os receptores dopaminérgicos $D_{2/3}$, exercem alguma ação no efeito demonstrado pela SePB.

2. METODOLOGIA

2.1 Drogas: A SePB (**Fig.1**), foi sintetizada no Núcleo de Síntese, Aplicação a Análise de Compostos Orgânicos e Inorgânicos (NUSAACOI) da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) - *Campus* Cerro Largo. Foi diluída em óleo de canola para administração intragástrica, no volume de 10 mL/kg. O antagonista sulpirida foi adquirido da Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, USA), diluído em solução salina 0,9% e administrado por via intraperitoneal (i.p.) no volume de 10 mL/kg.

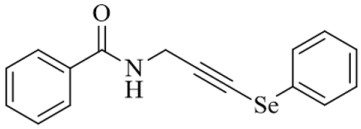


Figura 1. Estrutura química da benzamida *N*-(3-(fenilselenil)prop-2-in-1-ílica (SePB)

2.2 Animais: Os testes foram realizados em camundongos adultos machos da raça Swiss (25-30g) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas do Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da UFPel (CEEA 4903-2017). Os grupos de animais foram acondicionados em caixas separadas, sob temperatura de 22 ± 2ºC e mantidos em um ciclo de 12h claro/12h escuro. A dieta foi constituída de ração comercial (GUABI, RS, Brasil) e água fresca *ad libitum*

2.3 Procedimentos experimentais: Para investigar uma possível contribuição dos receptores $D_{2/3}$ sobre o efeito do tipo antidepressivo demonstrado pela SePB, camundongos adultos machos foram pré-tratados com sulpirida (50 mg/kg, i.p., um antagonista de receptores $D_{2/3}$) ou solução salina (10 ml/kg, i.p.). Após 15 min os animais receberam SePB (10 mg/kg, i.g.) ou óleo de canola (10 ml/kg, i.g.) e 30 minutos depois foram submetidos ao teste de suspensão da cauda (TSC). O TSC foi realizado conforme STERU *et al.* (1985), sendo avaliados os parâmetros tempo de imobilidade e latência para o primeiro episódio de imobilidade dos animais. Com o objetivo de descartar qualquer potencial efeito sedativo sobre os camundongos, 4 minutos antes do TSC foi realizado o teste do campo aberto (TCA) conforme WALSH *et al.* (1976), onde foi avaliado o número de cruzamentos nos quadrantes e o número de elevações.

2.4. Análise estatística: A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de D'agostino. Os dados experimentais foram demonstrados como média ± erro padrão da média. As comparações entre os grupos foram feitas por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Newman-Keuls, quando apropriado. Um valor de $p < 0.05$ foi considerado significativo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado em camundongos submetidos ao tratamento com SePB (10 mg/kg) mais salina 0,9% (**Fig. 2A**) uma redução significativa do tempo de

imobilidade [$F_{(1,24)}$ = 16,46, p < 0,001], quando comparado ao grupo controle. Estes resultados corroboram com o que o nosso grupo de pesquisa já havia elucidado, a SePB possui um efeito do tipo antidepressivo em camundongos (BESCKOW *et al.*, 2020). Este efeito foi bloqueado no grupo de animais que recebeu SePB (10 mg/kg) mais sulpirida (50 mg/kg), aumentando significativamente seu tempo de imobilidade [$F_{(1,24)}$ = 5,097, p = 0,033].

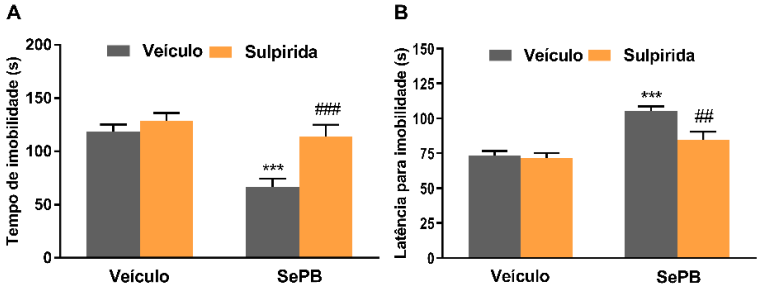


Figura 2 – Efeito do pré-tratamento com sulpirida (50 mg/kg, i.p.) (A: tempo de imobilidade; B: latência para imobilidade) 15 minutos antes da administração de SePB (10 mg/kg, i.g.). N = 7 - 8 animais por grupo. *** P <0,001 quando comparado ao controle tratado com veículo; ### P <0,001 ou ## P <0,01 quando comparado ao grupo pré-tratado com a SePB.

Em relação a latência para o primeiro episódio de imobilidade identificamos que houve um aumento significativo no grupo de animais que recebeu SePB (10 mg/kg) mais salina 0,9% [$F_{(1,26)}$ = 4,367, p = 0,047], quando comparados aos animais controles (**Fig. 2B**). Assim como ocorreu com a imobilidade total, a administração de SePB mais sulpirida resultou em um bloqueio do aumento da latência para imobilidade gerada pela administração de somente SePB [$F_{(1,34)}$ = 5,712, p < 0,0225]. Este fato é provavelmente resultante da dependência dos receptores $D_{2/3}$ no efeito terapêutico demonstrado pela SePB. Além disso, na **Tabela 1**, os resultados demonstram que não houve alteração no padrão locomotor nos animais, descartando qualquer interferência de algum possível efeito sedativo nos animais.

Tabela 1. Efeito da Administração de Sulpirida e/ou SePB no Teste do Campo Aberto (TCA)

Groups	Cruzamentos	Levantamentos
Controle	66,57 ± 7,44	34,00 ± 3,90
Sulpirida	67,57 ± 4,94	30,67 ± 2,93
SePB	64,71 ± 4,27	32,63 ± 1,49
SePB + Sulpirida	51,71 ± 1,73	26,00 ± 3,24

O número de cruzamentos e levantamentos está expresso como média ± erro padrão da média; (n = 6 - 8) animais por grupo.

Estudos pré-clínicos têm demonstrado que uma disfunção na neurotransmissão dopaminérgica pode contribuir para anedonia. De fato a cariprazina, um agonista parcial de receptores dopaminérgicos $D_{2/3}$, demonstrou efeito do tipo antidepressivo ao atenuar significativamente o comportamento anedônico de camundongos (DURIC *et al.*, 2017). Sendo assim, a relação entre o efeito demonstrado pela SePB e os receptores $D_{2/3}$ pode ser relevante,

visto que os tratamentos padrões para TDM – particularmente inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS's) – não são suficientes para atenuar os sintomas de anedonia na depressão (HOFLICH *et al.*, 2019).

4. CONCLUSÕES

Utilizando ferramentas farmacológicas demonstramos que o efeito do tipo antidepressivo apresentado pela SePB em camundongos depende da modulação de receptores $D_{2/3}$ e, consequentemente, do sistema dopaminérgico. Esse mecanismo de ação pode ser útil para atenuar sintomas como anedonia, o que ainda é um desafio para a terapia atual. Como perspectivas futuras, pretendemos avaliar se o efeito da SePB está relacionado a outros receptores de dopamina como: D_1 e D_2.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIL, H.; GORDON, J.; HEN, R.; JAVITCH, J. *et al.* Treatment resistant depression: A multi-scale, systems biology approach. **Neurosci Biobehav Rev**, Estados Unidos, v.84, p. 272-288, 2018.

BESCKOW, E. M.; NONEMACHER, N. T.; GARCIA, C. S.; DA SILVA ESPINDOLA, C. N. *et al.* Antidepressant-like effect of a selenopropargylic benzamide in mice: involvement of the serotonergic system. **Psychopharmacology (Berl)**, Alemanha, 2020.

DURIC, V.; BANASR, M.; FRANKLIN, T.; LEPACK, A. *et al.* Cariprazine Exhibits Anxiolytic and Dopamine D3 Receptor-Dependent Antidepressant Effects in the Chronic Stress Model. **Int J Neuropsychopharmacol**, Reino Unido, v.20, n. 10, p. 788-796, 2017.

HOFLICH, A.; MICHENTHALER, P.; KASPER, S.; LANZENBERGER, R. Circuit Mechanisms of Reward, Anhedonia, and Depression. **Int J Neuropsychopharmacol**, Reino Unido, v.22, n. 2, p. 105-118, 2019.

MALHI, G. S.; MANN, J. J. Depression. **Lancet**, Reino Unido, v.392, n. 10161, p. 2299-2312, 2018.

PENG, M.; MO, B.; LIU, Y.; XU, M. *et al.* Prevalence, risk factors and clinical correlates of depression in quarantined population during the COVID-19 outbreak. **J Affect Disord**, Holanda, v.275, p. 119-124, 2020.

PLETSCHER, A. The discovery of antidepressants: a winding path. **Experientia**, Suíça, v.47, n. 1, p. 4-8, 1991.

SAMPAIO, T. B.; BILHERI, F. N.; ZENI, G. R.; NOGUEIRA, C. W. Dopaminergic system contribution to the antidepressant-like effect of 3-phenyl-4-(phenylseleno) isoquinoline in mice. **Behav Brain Res**, Holanda, v.386, p. 112602, 2020.

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, Alemanha, v.85, n. 3, p. 367-370, 1985.

TORALES, J.; O'HIGGINS, M.; CASTALDELLI-MAIA, J. M.; VENTRIGLIO, A. The outbreak of COVID-19 coronavirus and its impact on global mental health. **Int J Soc Psychiatry**, Estados Unidos, v.66, n. 4, p. 317-320, 2020.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The Open-Field Test: a critical review. **Psychol Bull**, Estados Unidos, v.83, n. 3, p. 482-504,1976.

Graduação

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA

Saúde única

IV MOSTRA ACADÊMICA

PPGB Programa de Pós Graduação em Biotecnologia

O ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS $D_{2/3}$ NO EFEITO DO TIPO ANTIDEPRESSIVO DA BENZAMIDA N-(3-(FENILSELENIL)PROP-2-IN-1-ÍLICA (SePB) EM CAMUNDONGOS

LABIONEM

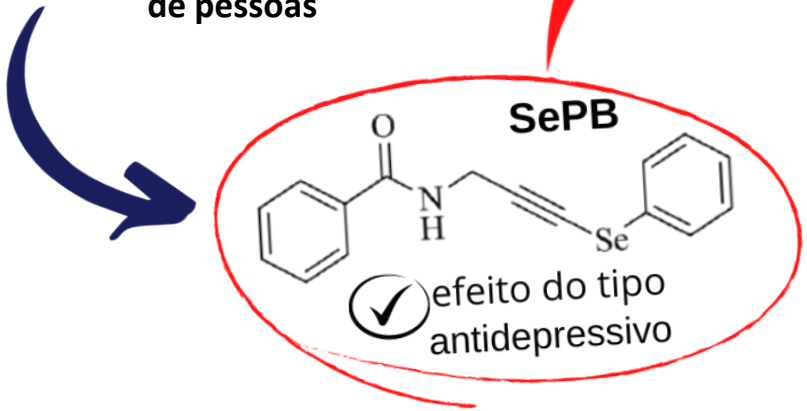
EVELYN MIANES BESCKOW[1]; GUSTAVO D'AVILA NUNES[1]; ÉVERTON BERWANGER BALBOM[2]; BENHUR GODOI[2]; CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO[1]; CÉSAR AUGUSTO BRÜNING[1].



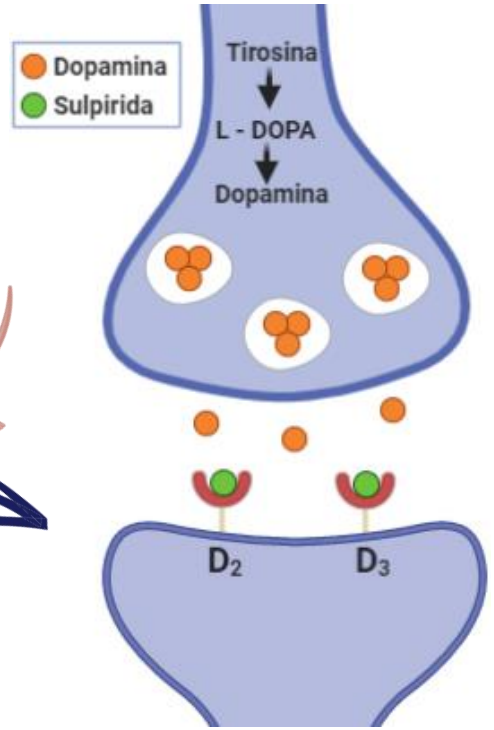
Depressão

Afeta cerca de 350 milhões de pessoas









Compostos contendo Selênio têm se destacado na busca de novos fármacos para depressão

Em estudos prévios, a benzamida N-(3-(fenilselenil)prop-2-in-1-ílica (SePB) apresentou efeito do tipo antidepressivo em camundongos

Neste trabalho, investigamos se os receptores $D_{2/3}$ estão envolvidos no mecanismo de ação da SePB

O antagonista dos receptores $D_{2/3}$ sulpirida foi administrado antes da SePB

A sulpirida bloqueou a ação do tipo antidepressiva da SePB demonstrando que o efeito deste composto é dependente dos receptores $D_{2/3}$

Referências: BESCKOW, E. M.; NONEMACHER, N. T.; GARCIA, C. S.; DA SILVA ESPINDOLA, C. N. *et al.* Antidepressant-like effect of a selenopropargylic benzamide in mice: involvement of the serotonergic system. **Psychopharmacology (Berl)**, Alemanha, 2020.
MALHI, G. S.; MANN, J. J. Depression. **Lancet**, Reino Unido, v.392, n. 10161, p. 2299-2312, 2018.

RÁPIDA E FÁCIL OBTENÇÃO DA NANOCELULOSE BACTERIANA MAGNÉTICA

FRANCIANE BATISTA NUNES[1]; FRANCIELE DA SILVA BRUCKMANN[2]; CRISTIANO RODRIGO BOHN RHODEN[3*]

[1]Universidade Franciscana – UFN – batistanunesfranciane@gmail.com
[2] Universidade Franciscana – UFN – francielebruckmann2@gmail.com
*[3]Universidade Franciscana – UFN – cristianorbr@gmail.com**

1. INTRODUÇÃO

As propriedades excepcionais da nanocelulose, como sua biocompatibilidade, baixa citotoxicidade, capacidade adsortiva e como carreadora de fármacos têm despertado a atenção de pesquisadores nos últimos anos. Este nanomaterial subsiste em três formas, nanocelulose bacteriana, nanocelulose cristalina e nanocelulose em fibras, tais materiais podem ser obtidos por diferentes métodos como por exemplo, hidrólise ácida e enzimática ou por processos mecânicos (ČOLIĆ; TOMIĆ; BEKIĆ, 2020). O nanopolímero supracitado é o mais abundante do planeta, o que viabiliza a sustentabilidade da extração do material (PHANTHONG et al., 2018). Não obstante, a presença de grupos funcionais em sua estrutura polimérica, conferem-lhe a capacidade de formação de nanocompósitos. Acerca dessa premissa, a ferrita pode ser incorporada em sua superfície e adicionar características magnéticas que poderão potencializar algumas das propriedades já mencionadas (SURESHKUMAR et al., 2016).

Dentre as possibilidades e vantagens do uso de materiais magnéticos, destacam-se a otimização de ensaios de adsorção, por meio da exclusão das etapas subsequentes de filtragem e centrifugação (RHODEN, 2018). Nos ensaios de atividade biológica, o emprego de um nanocarreador magnético, permite que o fármaco atue de forma específica, aumentando a eficácia terapêutica e reduzindo os efeitos adversos (JABBAR; AMMAR, 2019).

Recentemente Jozala e colaboradores (2016), desenvolveram um *stent* com revestimento magnético para reparo tecidual em caso de aneurisma. De semelhante modo, Sureshkumar e seus colaboradores (2010), também empregaram a nanocelulose bacteriana e sintetizaram um nanocompósito magnético com prata, buscando investigar as propriedades antibacterianas. Tendo em vista as inúmeras possibilidades de aplicação de materiais magnéticos, o presente trabalho teve como objetivo a obtenção de nanocelulose magnética de forma rápida e fácil para posteriormente explorarmos sua aplicação em diferentes áreas.

2. METODOLOGIA

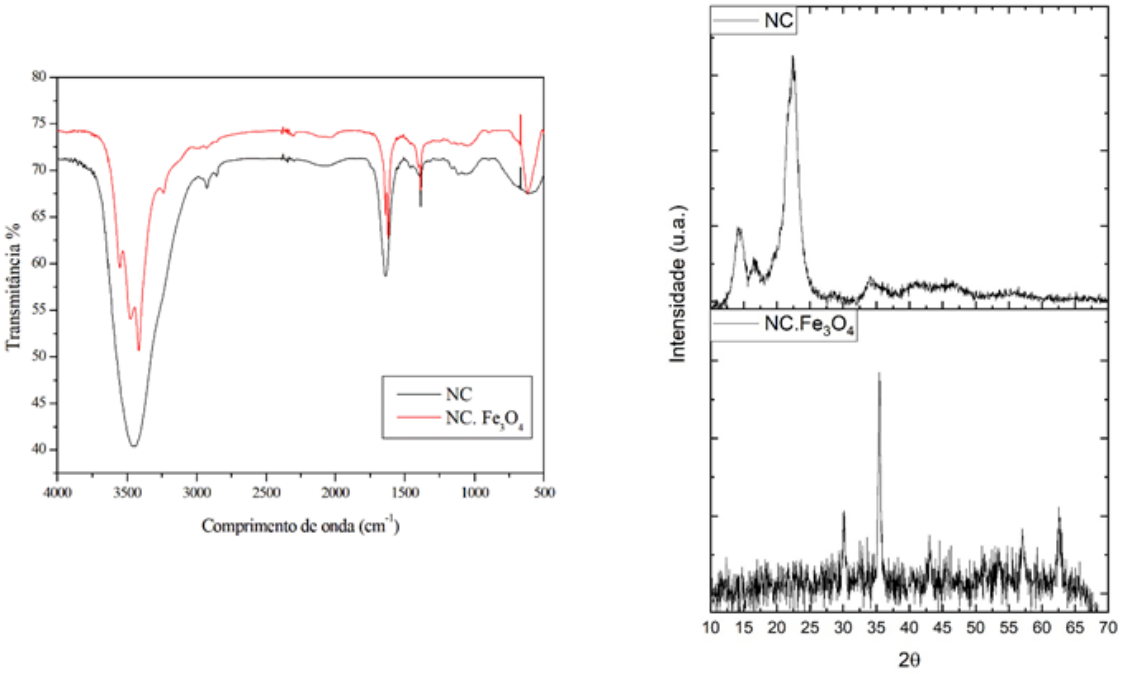
Para a obtenção da nanocelulose com propriedades magnéticas, seguiu-se a metodologia proposta por Rhoden et al (2017). Em um balão de fundo redondo, adicionou-se a nanocelulose, o $FeCl_2$ e submeteu-se a a condições oxidação, posteriormente quando o material já apresentava comportamento magnético, a

reação foi extraída com metanol e acetona e sequencialmente levada a estufa para evaporação dos solventes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio da técnica de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), foi possível evidenciar bandas características da nanocelulose, bem como, a incorporação da ferrita em sua estrutura. Na região de 3477cm^{-1} observa-se uma banda oriunda do estiramento da ligação O-H, em aproximadamente 1620 cm^{-1} um pico adicional em razão da absorção de água pelas moléculas da celulose, em 1347 cm^{-1} um pico referente ao estiramento da ligação CH_2 (MARIÑO BOHÓRQUEZ et al., 2017). No espectro de FTIR da nanocelulose magnética, além dos picos manterem-se constantes, têm-se o aparecimento de uma banda inexistente anteriormente, na região de 600 cm^{-1} relacionada ao estiramento da ligação Fe-O proveniente do Fe_3O_4, evidenciando que a ferrita foi incorporada a superfície da nanocelulose (RHODEN et al., 2017).

Figura 1- Espectros de FTIR e DRX da nanocelulose e nanocelulose magnética



Fonte: Construção do Autor

Por meio da técnica de difração de raios-X (DRX), foi possível evidenciar a cristalinidade do nanomaterial pelo aparecimento de picos em 2θ ≈ 16º e 22°, no DRX da celulose magnética, os picos em torno de 2θ ≈ 30°, 35°, 43°, 57°e 65º correspondem aos planos cristalinos do Fe_3O_4. Além disso, observa-se que os picos característicos da nanocelulose foram parcialmente suprimidos pela incorporação da ferrita, confirmando a obtenção da nanocelulose com propriedades magnéticas (SURESHKUMAR, 2010; RHODEN, 2018).

4. CONCLUSÕES

Pode-se auferir que a nanocelulose magnética foi obtida de forma rápida e eficaz, podendo ser evidenciada pelas das técnicas instrumentais de espectroscopia de infravermelho e difratograma de raios-X e comprovada por meio da aproximação de um campo magnético. De acordo com as vastas características e propriedades da nanocelulose, diversos estudos serão realizados explorando desse nanomaterial, ademais, cabe ressaltar ainda, a necessidade de complementação com maiores caracterizações do nanomaterial obtido.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ČOLIĆ, M.; TOMIĆ, S.; BEKIĆ, M. Immunological aspects of nanocellulose. **Immunology Letters**, 2020.

JABBAR, T. A.; AMMAR, S. H. Core/shell phosphomolybdic acid-supported magnetic silica nanocomposite (Ni@SiO_2-PMo): Synthesis, characterization and its application as a recyclable antibacterial agent**. Colloid and Interface Science Communications**, v. 33, p. 100214, 2019.

JOZALA, A. F. et al. Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 2063-2072, 2016.

MARIÑO BOHÓRQUEZ, M. A. et al. **Caracterização de nanocelulose do bagaço de laranja e imobilização de enzimas hidrolíticas visando seu aproveitamento durante a etapa da hidrólise de celulose**. 2017.135 f. Tese de Doutorado (Doutora em Ciências), Universidade de Campinas, 2017.

PHANTHONG, P. et al. Nanocellulose: Extraction and application. **Carbon Resources Conversion**, v. 1, n. 1, p. 32-43, 2018.

RHODEN, C. R. B. et al. Síntese fácil e direta do óxido de grafeno magnético. **Disciplinarum Scientia| Naturais e Tecnológicas**, v. 18, n. 2, p. 389-397, 2017.

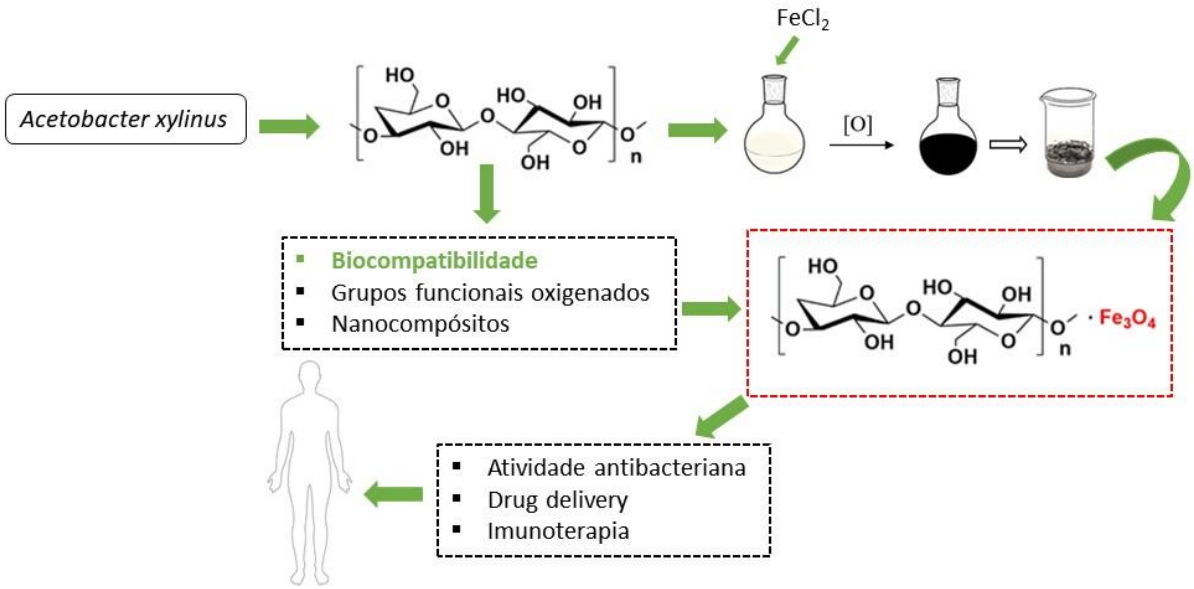
RHODEN, C. R. B. **Síntese de análogos de peptídeos incorporados a materiais nanoparticulados de carbono funcionalizados via reações multicomponentes**. 2018. 107f. Tese de Doutorado (Doutor em Nanociências), Universidade Franciscana, 2018.

SURESHKUMAR, M.; SISWANTO, D. Y.; LEE, Cheng-Kang. Magnetic antimicrobial nanocomposite based on bacterial cellulose and silver nanoparticles. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 33, p. 6948-6955, 2010.

SURESHKUMAR, V. et al. Fabrication of chitosan–magnetite nanocomposite strip for chromium removal. **Applied Nanoscience**, v. 6, n. 2, p. 277-285, 2016.

RÁPIDA E FÁCIL OBTENÇÃO DA NANOCELULOSE BACTERIANA MAGNÉTICA

FRANCIANE BATISTA NUNES; FRANCIELE DA SILVA BRUCKMANN; CRISTIANO RODRIGO BOHN RHODEN
cristianorbr@gmail.com*



RÁPIDA E FÁCIL OBTENÇÃO DE EUGENOL COM PROPRIEDADES MAGNÉTICAS

FRANCIELE DA SILVA BRUCKMANN[1]; FRANCIANE BATISTA NUNES[2]; THEODORO DA ROSA SALLES[3]; SÉRGIO ROBERTO MORTARI[4]; CRISTIANO RODRIGO BOHN RHODEN[5]

[1]Universidade Franciscana – UFN – francielebruckmann2@gmail.com
[2] Universidade Franciscana – UFN- batistanunesfranciane@gmail.com
[3] Universidade Franciscana – UFN- theodoro.rsalles@gmail.com
[4] Universidade Franciscana – UFN- mortari@ufn.edu.br
*[5] Universidade Franciscana – UFN- cristianorbr@gmail.com**

1. INTRODUÇÃO

As nanopartículas magnéticas (MNPs), em especial com comportamento superparamagnético, têm se mostrado promissoras na área farmacêutica, uma vez que demonstram-se biocompatíveis, não imunogênicas e com baixa toxicidade. Além disso, respondem de forma rápida e forte a um campo magnético, podendo ser veiculadas no organismo e serem direcionadas ao órgão/ tecido alvo (UNSOY et al., 2012; IQBAL et al., 2017).

Recentemente, a literatura têm reportado o emprego de MNPs em ensaios de atividade antibacteriana, antifúngica, antioxidante e em sistemas de entrega direcionada de fármacos (PATIL et al., 2018; BRUSCHI.; DE TOLEDO, 2019). Dentre os compostos com excelentes propriedade farmacológicas, o eugenol (4-alil-2-metoxifenol), componente majoritário do cravo da índia, têm sido empregado em sistemas nanoparticulados e têm demonstrado excelente propriedade antibacteriana, antioxidante, antinflamatória e antiproliferativa (TALÓN et al., 2019; SHAHABADI et al., 2019; ESMAEILI et al., 2016).

Tendo em vista, as propriedades farmacológicas deste óleo essencial, pouco têm sido explorado sua incorporação em sistemas magnéticos. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi obter de forma simples e rápida o eugenol magnético, para posteriormente utilizá-lo em ensaios biológicos.

2. METODOLOGIA

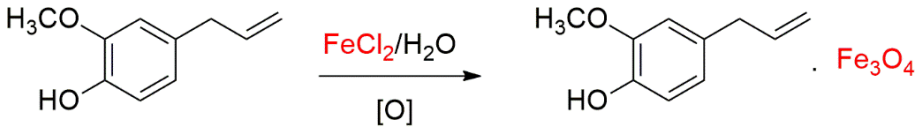
A magnetização do eugenol foi realizada conforme descrito por Rhoden et al (2017). Para esta reação empregou-se um balão de fundo redondo de 250 mL, contendo 100 mL de água ultrapura previamente desoxigenada, em seguida, adicionou-se o equivalente a 100 mg de eugenol e 100 mg de cloreto de ferro II ($FeCl_2$) e hidróxido de amônio até atingir pH oxidante (pH≈ 9,0). Após, a mistura foi submetida a radiação ultrassônica e ao aquecimento a 80 ºC, intercalando as etapas durante 60 minutos. Sequencialmente, a solução foi vertida para um béquer, e, com o auxílio de um ímã para a retenção do material. O sólido foi lavado consecutivamente com metanol e acetona e posteriormente, o material

foi seco em estufa a 50 °C durante 20 minutos para total evaporação dos solventes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a obtenção do eugenol magnético, empregou-se a eugenol e o $FeCl_2$ e posteriormente, submeteu-se a condições de oxidação. Na figura abaixo está esquematizado o processo de magnetização do óleo essencial, bem como o produto gerado pela reação.

Figura 1- Estrutura química do eugenol magnético obtido no trabalho

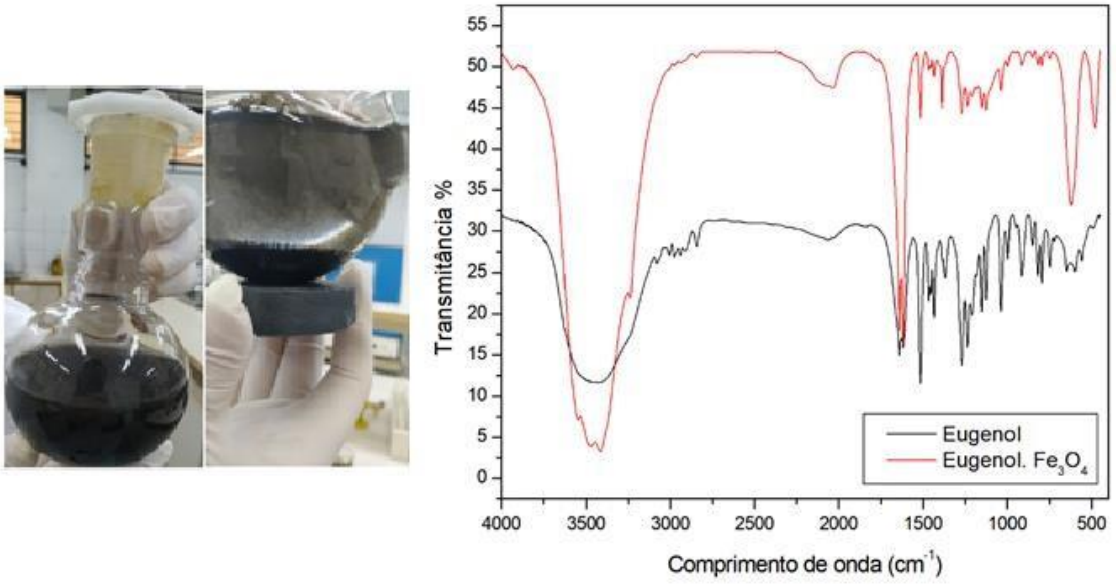


Fonte: Construção do autor

Na figura 2, confirma-se o comportamento do material magnético, mediante aproximação de um ímã, posteriormente, a reação foi lavada com solvente adequado sem perdas do material.

As amostras foram caracterizadas por meio da técnica de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier utilizando o equipamento da Perkin-Elmer, modelo Spectro One. As pastilhas foram obtidas com 2 mg de amostra e 200 mg do suporte (KBr).

Figura 2- Comportamento magnético e Espectro de infravermelho do eugenol e do eugenol magnético



Fonte: Construção do autor

No espectro de FTIR do eugenol, observa-se uma banda em torno de 3400 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação O-H, na região de 1600-1500 cm^{-1} referentes a ligação C=C e os picos agudos na região de 1200-700 cm^{-1} oriundos das ligações C=C do anel aromático (PRAMOD et al., 2015; NUCHUCHUA et al., 2009). No espectro do eugenol magnético, além das bandas se manterem constantes, o aparecimento de uma banda expressiva na região de 600 cm^{-1} é originada das vibrações Fe-O proveniente do Fe_3O_4 incorporado ao eugenol (RHODEN et al., 2017).

4. CONCLUSÕES

Por meio da caracterização de FTIR foi possível observar a incorporação da ferrita ao óleo essencial, bem como pôde-se ser comprovada pela aproximação de um campo magnético. Futuramente, caracterizações complementares e ensaios de citotoxicidade e atividade biológica serão desenvolvidos, visando determinar a segurança e as propriedades farmacológicas desta nanopartícula magnética.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRUSCHI, M. L.; DE TOLEDO, L. A. S. Pharmaceutical applications of iron-oxide magnetic nanoparticles. **Magnetochemistry**, v. 5, n. 3, p. 50, 2019.

ESMAEILI, F. et al. Anti-inflammatory effects of eugenol nanoemulsion as a topical delivery system. **Pharmaceutical development and technology**, v. 21, n. 7, p. 887-893, 2016.

IQBAL, A. et al. Recent advances in iron nanoparticles: preparation, properties, biological and environmental application. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 17, n. 7, p. 4386-4409, 2017.

NUCHUCHUA, O. et al. Physicochemical investigation and molecular modeling of cyclodextrin complexation mechanism with eugenol. **Food research international**, v. 42, n. 8, p. 1178-1185, 2009.

PATIL, P. B. et al. pH triggered curcumin release and antioxidant activity of curcumin loaded γ-Fe_2O_3 magnetic nanoparticles. **Materials Letters**, v. 223, p. 178-181, 2018.

PRAMOD, K. et al. Unveiling the compatibility of eugenol with formulation excipients by systematic drug-excipient compatibility studies. **Journal of Analytical Science and Technology**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2015.

RHODEN, C. R. B. et al. Síntese fácil e direta do óxido de grafeno magnético. **Disciplinarum Scientia| Naturais e Tecnológicas**, v. 18, n. 2, p. 149-147, 2017.

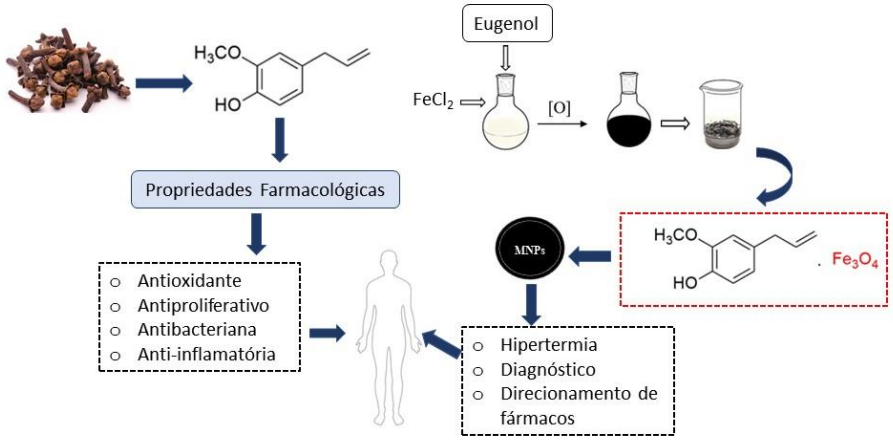
SHAHABADI, N. et al. Cytotoxicity and antibacterial activities of new chemically synthesized magnetic nanoparticles containing eugenol. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 49, p. 113-122, 2019.

TALÓN, E. et al. Antioxidant starch-based films with encapsulated eugenol. **Application to sunflower oil preservation**. Lwt, v. 113, p. 108290, 2019.

UNSOY, G. et al. Synthesis optimization and characterization of chitosan-coated iron oxide nanoparticles produced for biomedical applications. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, n. 11, p. 964, 2012.

RÁPIDA E FÁCIL OBTENÇÃO DE EUGENOL COM PROPRIEDADES MAGNÉTICAS

FRANCIELE DA SILVA BRUCKMANN; FRANCIANE BATISTA NUNES; THEODORO DA ROSA SALLES; CRISTIANO RODRIGO BOHN RHODEN
cristianorbr@gmail.com*



ÁCIDO TÂNICO: UM COMPOSTO FENÓLICO COM AÇÃO ANTIGLIOMA E ANSIOLÍTICA EM MODELO ANIMAL DE GLIOBLASTOMA

FRANCIELI DA SILVA DOS SANTOS[1]; NATÁLIA PONTES BONA[2]; NATHALIA STARK PEDRA[3]; LUIZA SPOHR[4]; MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES[5]; FRANCIELI MORO STEFANELLO[6]

[1]*Universidade Federal de Pelotas – tessmerfran@gmail.com*
[2] *Universidade Federal de Pelotas – natinhabona@hotmail.com*
[3] *Universidade Federal de Pelotas – nathaliastark@hotmail.com*
[4] *Universidade Federal de Pelotas – luizaspohr@hotmail.com*
[5] *Universidade Federal de Pelotas – mspereirasoares@gmail.com*
[6] *Universidade Federal de Pelotas – fmstefanello@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

O glioblastoma (GB) é o tumor cerebral humano mais comum e agressivo, com sobrevida média dos pacientes de apenas 14 a 15 meses (THAKKAR et al., 2014). Atualmente o tratamento é realizado com cirurgia, quando possível, seguido de radioterapia e quimioterapia, onde o quimioterápico padrão é a temozolomida (TMZ). O TMZ melhorou a sobrevida dos pacientes (GROSSMAN et al., 2016), entretanto o GB já apresenta mecanismos de resistência a ele (WOO et al., 2019), mostrando a importância de novas abordagens terapêuticas capazes de melhorar o prognóstico dos pacientes.

Os compostos naturais e extratos de plantas mostram-se promissores nesta busca, pois possuem interessante fonte de compostos bioativos (KAUR & VERMA, 2015). Entre estes compostos está o ácido tânico (AT), um ácido fenólico que pode ser encontrado em diversos alimentos como vinho tinto, café, chocolate entre outros (KUO et al., 1992). O AT exibe variadas propriedades farmacológicas, dentre elas ação anti-neuroinflamatória (WU et al., 2019) e antidepressiva (LUDUVICO et al., 2020).

Diante do exposto, este trabalho visa avaliar o efeito antitumoral do AT, bem como sobre parâmetros comportamentais em um modelo pré-clínico de glioblastoma.

2. METODOLOGIA

2.1. Animais

Para o modelo *in vivo* de glioma foram utilizados 30 ratos Wistar machos, com 60 dias de idade, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da instituição, sob o número de protocolo CEEA 31292-2018.

2.2. Protocolo *in vivo*

Para o implante de glioma intracerebroventricular os animais foram pré-anestesiados com administração intraperitoneal de cetamina e xilazina. As células C6 foram ressuspensas em meio DMEM e injetadas (3 µL) no estriado

(coordenadas em relação ao bregma, 3,0 mm lateral, 0,5 posterior e 6 mm de profundidade).

Cinco dias após a implantação os animais foram divididos em três grupos: (1) *Sham*, (2) Glioblastoma + Veículo, (3) Glioblastoma + AT (50 mg/kg/dia). O tratamento foi realizado durante 15 dias pela via intragástrica. No 9º dia de tratamento os animais foram submetidos ao teste de locomoção utilizando o aparelho de campo aberto (GERZSON et al., 2020), no 10° dia ao teste de reconhecimento de objetos (BRYAN et al., 2009) e no 11º dia ao teste do labirinto em cruz elevado (WALF & FRYE, 2007).

O teste de campo aberto consiste em uma caixa de madeira dividida em 16 quadrantes onde a capacidade de locomoção do animal é avaliada de acordo com o número de quadrantes cruzados no período de 5 minutos. O teste do labirinto em cruz elevado consiste em um aparelho com braços abertos e braços fechados cruzados um ao outro, sendo utilizado para avaliar a ansiedade nos animais. O teste de reconhecimento de objeto avalia a memória de reconhecimento de curto prazo, baseando-se na tendência dos ratos de interagir com novos objetos.

Após 21 dias da implantação do glioma os animais foram eutanasiados e os cérebros foram removidos, seccionados e fixados em formalina para posteriores análises. Três seções do cérebro de cada animal foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e analisadas por uma patologista. Foram capturadas imagens para quantificação do tamanho do tumor (utilizando um microscópio conectado a uma câmera). A área do tumor (mm^2) foi quantificada utilizando o software ImageJ. O volume total do tumor (mm^3) foi calculado multiplicando a seção da fatia e adicionando a área segmentada.

2.3. Análise estatística

Os dados foram analisados em triplicata utilizando a ANOVA de uma via seguida do *post-hoc* de Tukey e teste t de Student. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando $P<0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se na Figura 1 que o grupo controle (animais referentes ao grupo Glioblastoma + veículo) demonstrou tamanho médio do tumor de 400 mm^3. O grupo tratado com AT apresentou tamanho do tumor com valor médio de 200 mm^3, mostrando redução significativa de 50% do tamanho tumoral quando comparado ao grupo controle. O resultado corrobora com estudos prévios que demonstraram o efeito antitumoral (KARAKURTI et al., 2016) e antiglioma (ZHANG et al., 2018) do AT. Ademais, o presente estudo foi o primeiro a demonstrar o efeito antiglioma do AT *in vivo*.

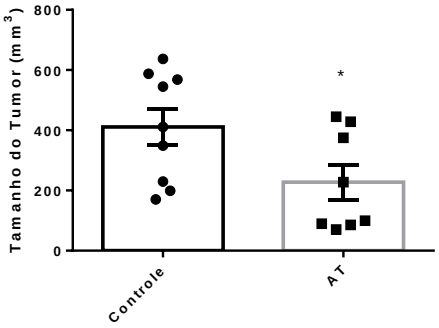


Figura 1. Análise do tamanho do tumor, volume total em mm³ determinado usando o software ImageJ (n = 8-9). Os dados foram analisados pelo teste t de Student. *P<0,05 quando comparado ao grupo controle.

Os resultados referentes aos testes comportamentais sugerem que, na avaliação da memória de reconhecimento de curto prazo, o AT não foi capaz de reverter os danos causados pela implantação do tumor (Figura 2B).

No teste do campo aberto (Figura 2A) observou-se uma redução significativa na locomoção dos animais com glioblastoma e o tratamento com AT foi capaz de reverter essa alteração, reestabelecendo esse parâmetro comportamental.

No teste do labirinto em cruz elevado, representado na Figura 2C, é possível observar uma redução significativa do tempo gasto nos braços abertos pelo grupo controle, demonstrando que os animais com glioblastoma apresentaram comportamento tipo-ansiogênico. Entretanto, no grupo tratado houve aumento significativo do tempo gasto nos braços abertos em relação ao grupo controle, sugerindo que o AT apresenta efeito tipo-ansiolítico nos animais.

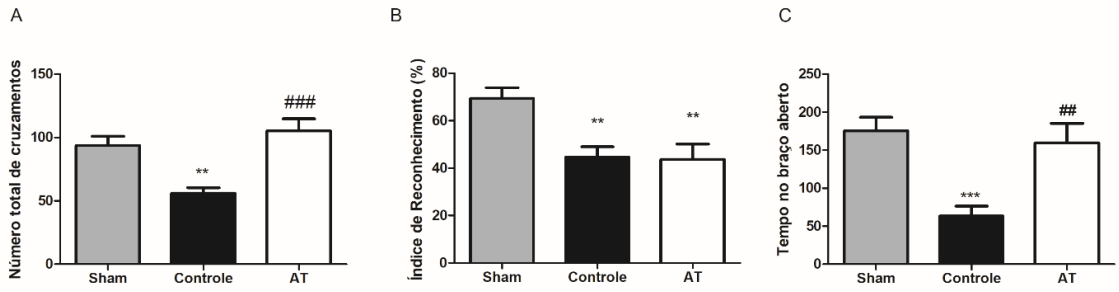


Figura 2. Testes comportamentais: (A) teste no aparelho de campo aberto; (B) teste de reconhecimento de objeto; (C) teste do labirinto em cruz elevado. Dados expressos como média ± erro médio padrão (n=7-10 animais por grupo) e analisados pela ANOVA de uma via seguida do *post-hoc* de Tukey. ** P<0,01 e *** P<0,001 quando comparado ao grupo controle. ## P<0,01 quando comparado ao *sham*.

4. CONCLUSÕES

Nosso trabalho demostrou um promissor efeito antiglioma do AT, reduzindo significativamente o tamanho do tumor. Além disso pode-se observar

que o ácido fenólico foi capaz de reverter os danos causados pelo glioma na locomoção e na ansiedade dos animais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRYAN, K. J.; LEE, H. G.; PERRY, G.; SMITH, M. A.; CASADESUS, G. Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease: Behavioral Testing and Considerations. In: BUCCAFUSCO, J. **Methods of Behavior Analysis in Neuroscience**, Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2009. Cap. 1.

GERZSON, M. F. B.; BONA, N. P.; SOARES, M. S. P.; TEIXEIRA, F. C.; RAHMEIER, F. L.; CARVALHO, F. B.; DA CRUZ, M. F.; ONZI, G.; LENZ, G.; GONÇALES, R. A.; SPANEVELLO, R. M.; Stefanello, F. M. Tannic Acid Ameliorates STZ-Induced Alzheimer's Disease-Like Impairment of Memory, Neuroinflammation, Neuronal Death and Modulates Akt Expression. **Neurotoxicity Research**, v. 37, p. 1009-1017, 2020.

GROSSMAN, STUART A.; ELLSWORTH, S. G. Published glioblastoma clinical trials from 1980 to 2013: Lessons from the past and for the future. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, p. suppl e13522, 2016.

KARAKURT, S.; ADALI, O. Tannic Acid Inhibits Proliferation, Migration, Invasion of Prostate Cancer and Modulates Drug Metabolizing and Antioxidant Enzymes. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 6, 2016.

KAUR, G.; VERMA, N. Nature curing cancer - review on structural modification studies with natural active compounds having anti-tumor efficiency. **Biotechnology Reports**, v. 6, p. 64-78, 2015.

KUO, M. L.; LEE, K. C.; LIN, J. K. Genotoxicities of nitropyrenes and their modulation by apigenin, tannic acid, ellagic acid and indole-3-carbinol in the Salmonella and CHO systems. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 270, n. 2, p. 87-92, 1992.

LUDUVICO, K. P. et al. Antidepressant Effect and Modulation of the Redox System Mediated by Tannic Acid on Lipopolysaccharide-Induced Depressive and Inflammatory Changes in Mice. **Neurochemical Research***, in press*, 2020.

THAKKAR, J. P.; DOLECEK, T. A.; HORBINSKI, C.; OSTROM, Q. T.; LIGHTNER, D. D.; BARNHOLTZ-SLOAN, J. S; VILLANO, J. L. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 23, n. 10, p. 1985-1996, 2014.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature Protocols**, v. 2, p. 322-328, 2007.

WOO, P. Y. M.; LI Y.; CHAN, A. H.; NG, S. C. P; LOONG, H. H. F.; CHAN, D. T. M.; WONG, G. K. C.; POON, W. A multifaceted review of temozolomide resistance mechanisms in glioblastoma beyond O-6-methylguanine-DNA methyltransferase. **Glioma**, v. 2, n. 2, p. 68-82, 2019.

WU, Y.; ZHONG, L.; YU, Z.; QI, J. Anti-neuroinflammatory effects of tannic acid against lipopolysaccharide-induced BV2 microglial cells via inhibition of NF-κB activation. **Drug Development Research**, v. 80, n. 2, p. 262-268, 2019.

ZHANG, J.; CHEN, D.; HAN, D. M.; CHENG, Y. H.; DAI, C.; WU, X. J.; CHE, F. Y.; HENG, X. Y. Tannic acid mediated induction of apoptosis in human glioma Hs 683 cells. **Oncology Letters**, v. 15, n. 5, p. 6845–6850, 2018.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

ÁCIDO TÂNICO: UM COMPOSTO FENÓLICO COM AÇÃO ANTIGLIOMA E ANSIOLÍTICA EM MODELO ANIMAL DE GLIOBLASTOMA

FRANCIELI DA SILVA DOS SANTOS[1]; NATÁLIA PONTES BONA[2]; NATHALIA STARK PEDRA[3]; LUIZA SPOHR[4]; MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES[5]; FRANCIELI MORO STEFANELLO[6]

Grupos experimentais: 1 (Sham), 2 e 3:

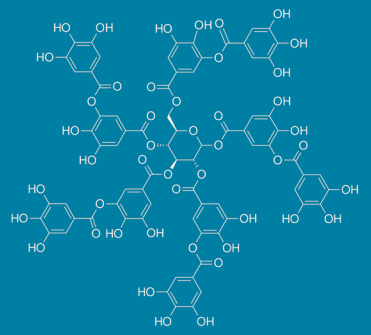
Implante de glioblastoma (GB) em ratos Wistar

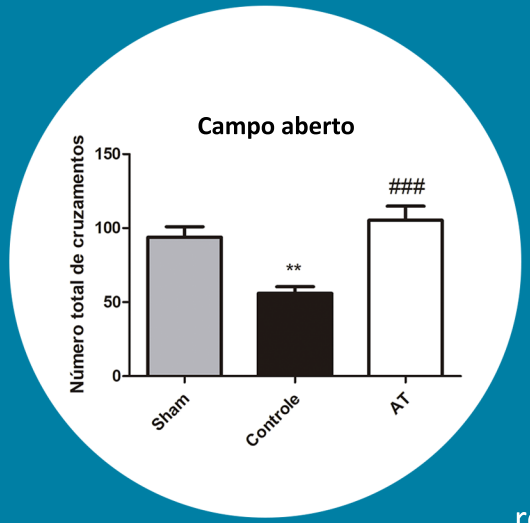


GRUPO 2
GB + Veículo

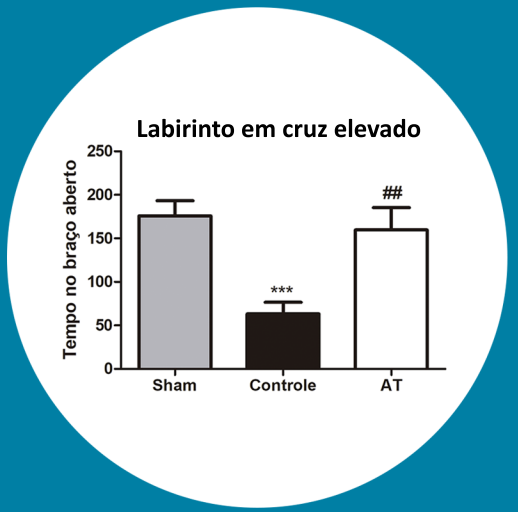
GRUPO 3
GB + AT

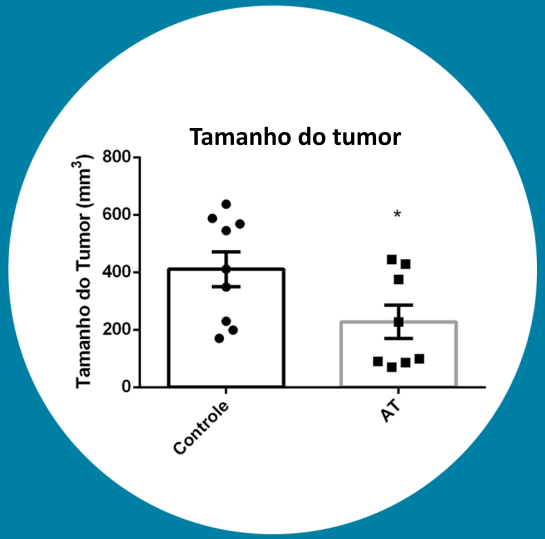
Ácido tânico (AT)





No teste de labirinto em cruz elevado o AT demonstrou ação tipo-ansiolítica

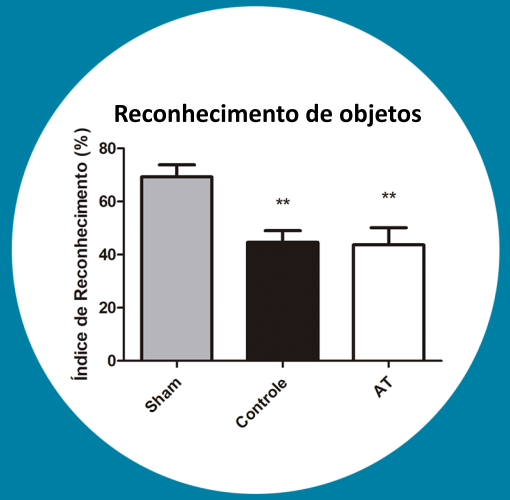




Os resultados demonstram que o AT foi capaz de reduzir em 50% o tamanho do tumor

Além disso o AT reverteu os danos a capacidade motora dos animais com GB

Porém não foi capaz de reverter os danos causados à memória de reconhecimento de curto prazo



AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS HÍBRIDOS MOLECULARES DA BETACALCOGENAMINA DI-TERC-BUTILFENÓLICO

GIULIANA P. ZUGNO[1]; PALOMA T. BIRMANN[2]; RENATA A. BALAGUEZ[3]; EVELYN TERHAAG[3]; FÁBIO ZAZYKI GALETTO[3]; LUCIELLI SAVEGNAGO[4]

[1]Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil. giulizugno@gmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil. paloma_birmann@hotmail.com
[3]Universidade Federal de Santa Catarina, SC, Brasil. renata.balaguez@gmail.com, evelynterhaag@gmail.com e galettofz@gmail.com
[4]Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil. luciellisavegnago@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O selênio (Se) é um oligoelemento pertencente ao grupo dos calcogênios, e fisiologicamente, ele está relacionado a proteção do organismo frente ao dano oxidativo (BHOWMICK et al., 2015) por apresentar-se incorporado à selenoproteínas com atividade antioxidante, como a glutationa peroxidase (GPx). Além disso, o Se desempenha uma função importante ao suprimir a ativação de vias pró-inflamatórias reguladas pelo fator de transcrição Nuclear Kappa-beta (NF-κβ). Nesse sentido, moléculas antioxidantes contendo Se em sua estrutura são importantes promotoras da manutenção do equilíbrio entre os sistemas antioxidante e pró-oxidante, evitando que ocorra o dano oxidativo às biomoléculas estruturais do organismo (COLLIN,2019).

Em vista da importância dos mecanismos de defesa antioxidantes para neutralização de promotores do estresse oxidativo, somando-se as propriedades promissores do Se, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de compostos híbridos moleculares da betacalcogenamina di-terc-butilfenólico, os quais foram denominados por **5p**, **5g** e **5k** (Figura 1). Vale ressaltar que a estrutura molecular desses compostos inclui substâncias fenólicas combinadas com Se, ambas muito conhecidas por seus potenciais de neutralização de espécies reativas, o que as fazem alvos promissores para o desenvolvimento de novas terapias antioxidantes.

2. METODOLOGIA

Os compostos foram sintetizados pelo Laboratório de Síntese Multicomponente, da Universidade Federal de Santa Catarina, posteriormente foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações 0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 50 µM e 100 µM para realização dos ensaios antioxidantes *in vitro*.

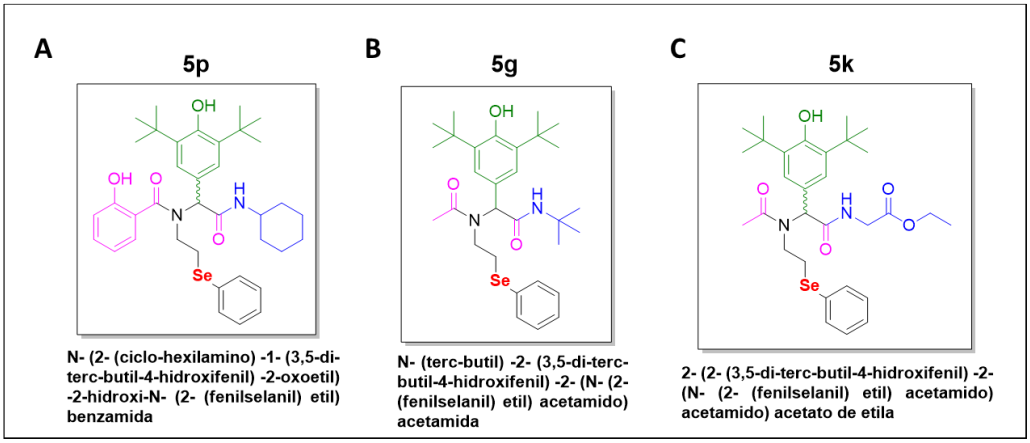


Figura 1. Estruturas químicas dos compostos híbridos moleculares da betacalcogenamina di-terc-butilfenólico. (A) N- (2- (ciclo-hexilamino) -1- (3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) -2-oxoetil) -2-hidroxi-N- (2- (fenilselanil) etil) benzamida. (B) N- (terc-butil) -2- (3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) -2- (N- (2- (fenilselanil) etil) acetamido) acetamida. (C) 2- (2- (3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) -2- (N- (2- (fenilselanil) etil) acetamido) acetamido) acetato de etila.

A atividade de eliminação de radicais livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila ($DPPH^{\bullet+}$) foi adaptada do método de Choi et al. (2002). O método de neutralização dos radicais 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) ($ABTS^{+}$) foi realizado de acordo com a técnica de Re et al. (1999) com algumas modificações. O teste do poder redutor do íon ferro (FRAP) foi adaptado de acordo com o método de Stratil et al. (2006).

Todos os ensaios *in vitro* foram realizados em triplicatas e os resultados avaliados através de análises de variância unidirecional (ANOVA), seguida pelo teste *pos hoc* de Tukey. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão da média (DP) e a diferença foi considerada estatisticamente significativa com uma probabilidade inferior a 5% ($p < 0,05$). Também foram calculadas a potência representada pela concentração do composto capaz de inibir 50% da formação dos radicais livres (IC_{50}) e sua eficácia representada pela porcentagem de inibição máxima ($I_{Máx}$), por meio do software *Graphpad Prism*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados revelam que todos os compostos foram capazes de capturar os radicais $DPPH^{\bullet+}$, sendo que os valores de $I_{MÁX}$ seguiram a ordem **5p** > **5k** > **5g**. Contudo, o **5p** demonstrou ser o mais potente em capturar os radicais $DPPH^{\bullet+}$, apresentando IC_{50} de 9,1 µM (Tabela 1).

Reforçando os dados anteriores, todas as moléculas avaliadas demonstraram atividade de eliminação dos radicais $ABTS^{+}$. O composto **5g** apresentou ser o mais potente na neutralização dos radicais $ABTS^{+}$ quando comparado aos compostos **5k** e **5p**, sendo os valores de IC_{50} de 4,1 µM, 6,2 µM e 12,5 µM, respectivamente. Em adição a isso, os três compostos demonstraram

a mesma eficácia na atividade de neutralização dos radicais $ABTS^{+}$, sendo apresentada pelos valores de $I_{MÁX}$ **5g** = **5k** = **5p** (Tabela 2).

O teste FRAP foi realizado para determinar o potencial redutor dos compostos híbridos moleculares da betacalcogenamina di-terc-butilfenólica. De acordo com os resultados apresentados na tabela 3, os compostos **5k** e **5p** apresentaram poder redutor na concentração de 50 µM, enquanto **5g** mostrou atividade apenas na concentração de 100 µM quando comparados ao controle.

Tabela 1. Efeito dos compostos na atividade *scavenger* do radical $DPPH^{\bullet+}$

Compostos	Concentração molar dos compostos (µM)					IC_{50}	$\%I_{MÁX}$
	0,1	1	10	50	100		
5g	-	8,9 ± 4,7	8,9 ± 2,7	11,5 ± 1,2	24,6 ± 2,0***	-	24,6 ± 2,0
5k	-	2,6 ± 2,6	14,7 ± 2,7	28,5 ± 5,8**	36,1 ± 4,6***	-	36,1 ± 4,6
5p	0,0 ± 0,0	12,8 ± 2,3**	50,6 ± 3,4***	86,4 ± 0,6***	88,3 ± 0,8***	9,1 (7,7 a 10,7)	88,3 ± 0,8

Valores apresentados como uma porcentagem de inibição dos radicais $DPPH^{\bullet+}$ em relação ao controle expressos como a média ± desvio padrão da média (DP) (n = 3). O IC_{50} indica a concentração capaz de inibir 50% da formação dos radicais $DPPH^{\bullet+}$. O $I_{Máx}$ representa a porcentagem de inibição máxima apresentada pelo composto. Os asteriscos atribuem a diferença significativa (* p < 0,05; ** p < 0,01; e *** p < 0;001) quando comparados ao controle pela ANOVA unidirecional seguida pelo teste *pos hoc* de Tukey.

Tabela 2. Efeito dos compostos na neutralização dos radicais $ABTS^{+}$

Compostos	Concentração molar dos compostos (µM)					IC_{50}	$\%I_{MÁX}$
	0,1	1	10	50	100		
5g	10,5 ± 3,1	15,3 ± 5,1*	73,5 ± 3,6***	96,5 ± 1,1***	89,2 ± 3,3***	4,1 (2,9 a 5,9)	96,5 ± 1,1
5k	-	17,1 ± 4,7	58,0 ± 4,3***	95,4 ± 2,0***	90,0 ± 6,0***	6,2 (4,0 a 9,2)	95,4 ± 2,0
5p	-	16,2 ± 1,6	41,7 ± 5,11	76,0 ± 15,6*	86,7 ± 8,7***	12,5 (5,5 to 24,2)	86,7 ± 8,7

Valores apresentados como uma porcentagem de inibição dos radicais ABTS+ em relação ao controle expressos como a média ± desvio padrão da média (DP) (n = 3). O IC_{50} indica a concentração capaz de inibir 50% da formação dos radicais $ABTS^{+}$. O $I_{Máx}$ representa a porcentagem de inibição máxima apresentada pelo composto. Os asteriscos atribuem a diferença significativa (* p < 0,05; ** p < 0,01; e *** p < 0;001) quando comparados ao controle pela ANOVA unidirecional seguida pelo teste *pos hoc* de Tukey.

Tabela 3. Efeito dos compostos pelo método FRAP

Compostos	Concentração molar dos compostos (µM)				
	0,1	1	10	50	100
5g	-	0,2 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,9 ± 0,2	1,5 ± 0,3**
5k	-	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,1	1,0 ± 0,1*	1,5 ± 0,2***
5p	-	0,3 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,9 ± 0,1*	1,4 ± 0,2***

Os valores mostram a absorbância a 593 nm do potencial de redução de íons férricos quando comparados ao controle e são expressos como a média ± desvio padrão da média (DP) (n = 3). Os asteriscos representam a diferença significativa (* p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001) quando comparados ao controle (0,4 ± 0,1) por ANOVA unidirecional, seguida pelo teste *pos hoc* de Tukey.

Nesse cenário, pesquisas que se concentram no desenvolvimento de estratégias baseadas em terapias antioxidantes capazes de amenizar ou eliminar eficientemente os efeitos deletérios do estresse oxidativo são necessárias para futuras abordagens terapêuticas. Mais especificamente, evidencia-se o potencial antioxidantes de moléculas contendo Se associadas a outros compostos que ofereçam vantagens para a obtenção de uma maior capacidade de neutralização das espécies reativas presentes em quantidades excedentes. O Se é um oligoelemento essencial e constituinte dos aminoácidos selenocisteína e selenometionina, os quais são incorporados a proteínas como

a enzima glutationa peroxidase (GPx), que juntamente com a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), representam as principais defesas antioxidantes enzimáticas do organismo (AGUILAR et al, 2016). Além disso, o Se é um imunomodulador ativo que favorece o sistema de defesa antioxidante sendo capaz de reduzir a atividade pró-inflamatória por meio da quelação de radicais livres. Desta forma, o Se exerce um papel fundamental na prevenção do desenvolvimento de doenças crônicas.

4. CONCLUSÕES

Desta maneira, podemos destacar os compostos **5p**, **5g** e **5k** como alvos promissores para estudos mais aprofundados quanto ao seu potencial antioxidante no tratamento de fisiopatologias relacionadas ao estresse oxidativo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, T.A.F. et al. Endogenous Antioxidants: A Review of their Role in Oxidative Stress. In: GONZALEZ, A.M.; GONZALEZ, J.A.M; SANTILLAN, E.O.M. **A Master Regulator of Oxidative Stress - The Transcription Factor Nrf2**.Croácia: IntechOpen, 2016. Cap. 1, p. 3-19.

BHOWMICK, D. et al. Insights into the catalytic mechanism of synthetic glutathione peroxidase mimetics. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 13, n.41, 2015.

CHOI, C.W. et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, v.163, n.6, p.1161-1168, 2002.

COLLIN, F. Chemical Basis of Reactive Oxygen Species Reactivity and Involvement in Neurodegenerative Diseases. **International Journal of Molecular Science**, v. 20, n.10, 2019.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology & medicine**, Estados Unidos da América, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

STRATIL, P. et al. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables-evaluation of spectrophotometric methods. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n.3, p.607-616, 2006.

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS HÍBRIDOS MOLECULARES DA BETACALCOGENAMINA DI-TERC-BUTILFENÓLICO

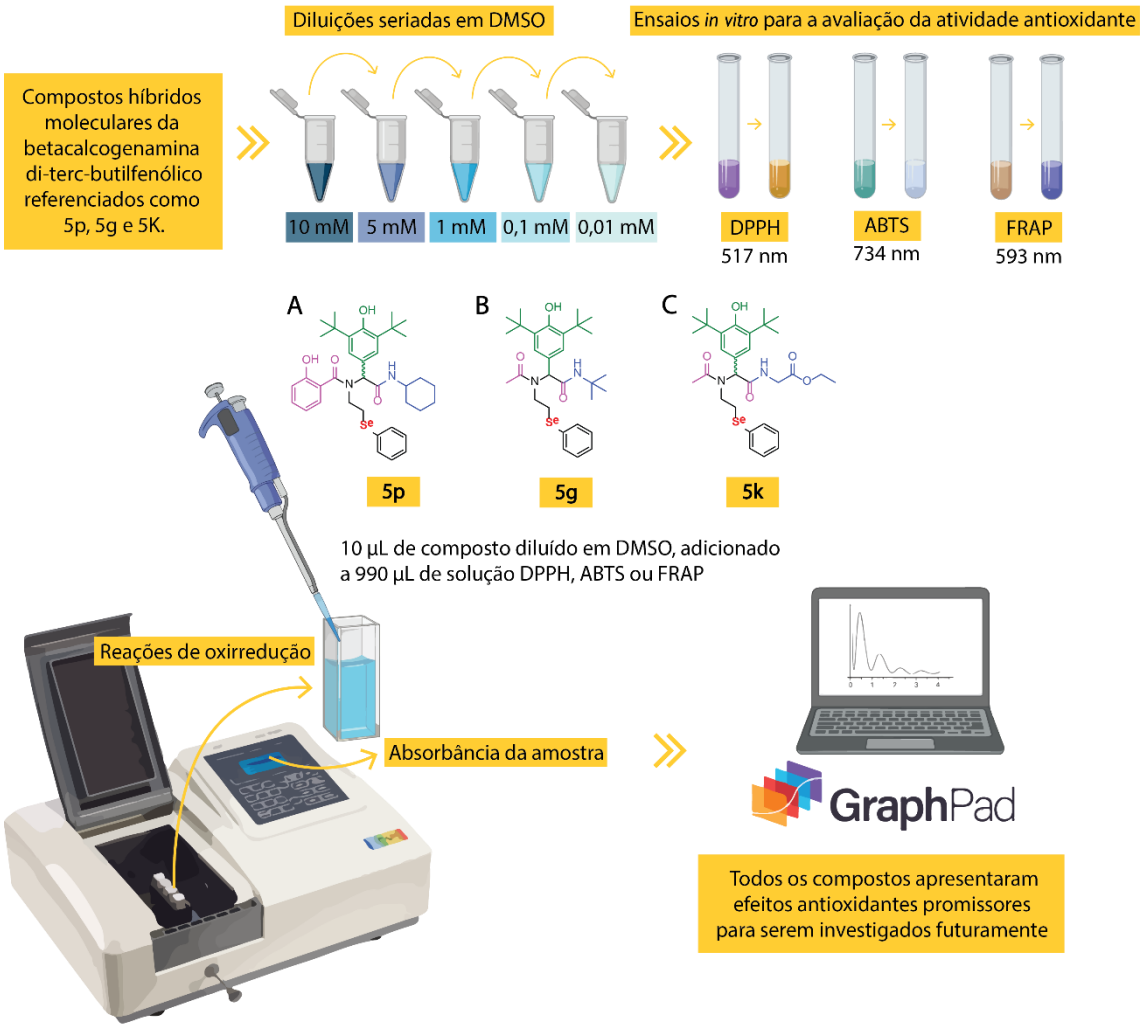


Figura 1. Resumo gráfico ilustrativo das etapas para a avaliação *in vitro* da capacidade antioxidantes dos compostos (A) N-(2-(ciclo-hexilamino)-1- (3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil)-2-oxoetil)-2-hidroxi-N- 2-(fenilselanil)etil) benzamida. (B) N- (terc-butil) -2-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil)-2-(N-(2-(fenilselanil)etil)acetamido)acetamida. (C) 2-(2-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil)-2-(N- (2- (fenilselanil) etil) acetamido) acetamido) acetato de etila. Dimetilsulfóxido (DMSO).

ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS 5-HT$_{2A/2C}$ NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DE UMA BENZAMIDA SELENOPROPARGÍLICA NO TESTE DE IMERSÃO DA CAUDA EM CAMUNDONGOS

GUSTAVO D'AVILA NUNES[1]; KAUANE NAYARA BAHR LEDEBUHR[1]; EVELYN MIANES BESCKOW[1]; BENHUR GODOI[2]; CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO[1]; CÉSAR AUGUSTO BRÜNING[1]

[1]Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM), Universidade Federal de Pelotas – gustavodnunes@gmail.com; cabruning@yahoo.com.br.
[2]Núcleo de Síntese, Aplicação e Análise de Compostos Orgânicos e Inorgânicos (NUSAACOI), Universidade Federal da Fronteira Sul.

1. INTRODUÇÃO

Caracterizada por ocorrer a partir do processamento de um estímulo danoso, a nocicepção é responsável pelo processamento de sinalizações que resultam na dor (LOESER E TREEDE, 2004). Sendo assim, a percepção de sensações diversas, como a irritação, inflamação e latejo, permite associar a dor como um mecanismo protetor mediado por terminações nervosas livres, denominadas nociceptores (BEAR *et al*., 2017). Normalmente, um estímulo nocivo de alto limiar promove a ativação dos canais iônicos dos nociceptores, resultando no encaminhamento do sinal modulado para o Sistema Nervoso Central, viabilizando a integração da dor (ARMSTRONG E HERR, 2019).

Atualmente, os fármacos analgésicos mais utilizados para o controle da transmissão dor apresentam eficácia reduzida, além de causarem diversos efeitos colaterais (BRUNING *et al*., 2014). Sendo assim, ainda que a patologia seja considerada uma função fisiológica vital, o seu tratamento deve ser priorizado em virtude do envolvimento de aspectos sensoriais, comportamentais e cognitivos, tornando-a uma experiência indesejável (JARACZ et al., 2016; WILHELM *et al.,* 2019). Com isso, torna-se necessário investigar novos alvos terapêuticos que possibilitem a redução de alterações ocasionadas.

Dados da literatura indicam que os compostos orgânicos de selênio são agentes farmacológicos considerados promissores, tendo em vista seus efeitos do tipo antioxidante, antinociceptivo e anti-inflamatório (NOGUEIRA *et. al*., 2004; WILHELM *et al.,* 2019). Além disso, já foi relatado a interação entre a ação destes compostos com o sistema serotoninérgico (BESCKOW *et al*., 2020).

Nosso grupo de pesquisa já verificou o efeito do tipo antinociceptivo da benzamida N-(3-(fenilselenil)prop-2-in-1-ílica (SePB) em camundongos submetidos ao teste da chapa quente, da imersão da cauda e no teste do glutamato (LEDEBUHR, 2019). Sendo assim, o objetivo do trabalho foi determinar o envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito do tipo antinociceptivo causado pelo SePB em camundongos.

2. METODOLOGIA

2.1. Drogas: O SePB (Figura 1) foi sintetizado no Núcleo de Síntese, Aplicação e Análise de Compostos Orgânicos e Inorgânicos (NUSAACOI), da Universidade Federal da Fronteira do Sul. A diluição do composto foi feita em óleo de canola. Para avaliação do envolvimento do sistema serotoninérgico, utilizou-se a cetanserina como antagonista dos receptores 5-$HT_{2A/2C}$ (Sigma–Aldrich, USA) e solubilizada em solução salina 0,9% para a dose de 0,3 mg/kg. Todas as administrações aos animais foram realizadas no volume de 10 mL/kg.

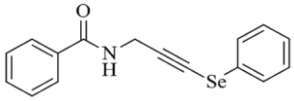


Figura 1 - Molécula da benzamida N-(3-(fenilselenil)prop-2-in-1-ílica (SePB).

2.2. Animais: Foram utilizados camundongos Swiss machos adultos, pesando entre 25 e 30g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas. Os animais foram mantidos em caixas em um ciclo de 12h claro e 12 escuro e sob condições padrão de temperatura a 22°C. Além disso, água e comida foram disponibilizadas até o momento dos testes comportamentais.

2.3. Delineamento experimental: Para realização dos testes comportamentais, os animais foram divididos em 4 grupos. Dessa forma, a investigação do envolvimento dos receptores serotoninérgicos 5-$HT_{2A/2C}$ ocorreu a partir do tratamento, via intraperitoneal (i.p.), do antagonista cetanserina (0,3 mg/kg) ou de solução salina nos animais. Após 15 minutos da administração inicial, os camundongos foram tratados com óleo de canola (i.g.) ou com o composto SePB (10 mg/kg, i.g.). O teste do campo aberto (TCA) foi efetuado 26 minutos após a realização do tratamento, seguido pelo teste de imersão da cauda.

2.4. Testes comportamentais: O TCA é utilizado para descartar a presença de possíveis déficits locomotores nos animais decorrentes da administração do antagonista ou do SePB. Após 26 minutos da realização do tratamento, os animais foram colocados em uma caixa dividida em 9 quadrantes iguais, a fim de determinar o número de cruzamentos e de levantamentos durante 4 minutos (WALSH E CUMMINS, 1976). Imediatamente após o TCA os animais foram submetidos ao teste de imersão da cauda. A cauda dos animais foi submersa em água (52°C) e foi contabilizado o tempo em que o camundongo levava para removê-la após o estímulo nociceptivo térmico. Para avaliar a resposta basal dos animais, o teste de imersão da cauda também foi efetuado antes do tratamento com a cetanserina e o SePB, conforme sugerido por JANSSEN et al. (1963).

2.5. Análise estatística: Os resultados foram expressos como média ± erro padrão e a normalidade dos dados foi efetuada a partir do teste de D'Agostino. A comparação entre os grupos foi realizada por ANOVA de duas vias, seguida por Newman-Keuls. Valores de $p<0.05$ foram considerados significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O procedimento experimental efetuado possibilitou avaliar que, conforme mostrado na Fig. 2, quando administrado com o veículo, o SePB aumentou a

latência para a retirada da cauda sob a aplicação do estímulo térmico na imersão da água. Isso indica que o composto apresentou um efeito do tipo antinociceptivo nos animais. Entretanto, a cetanserina demonstrou um papel bloqueador da ação farmacológica do SePB, tendo em vista que promoveu a redução da latência durante o teste. O resultado corrobora a hipótese de que o composto atua sobre os receptores 5-HT$_{2A/2C}$ do sistema serotoninérgico.

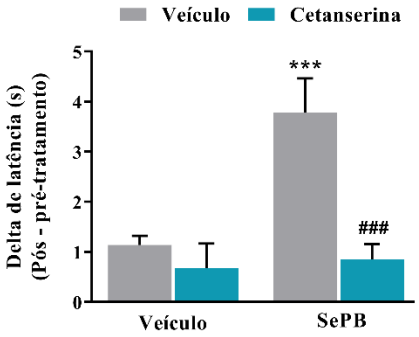


Figura 2 – Avaliação da interação do SePB com o antagonista cetanserina no teste de imersão da cauda (***) p<0,001 quando comparado ao grupo controle e (###) p<0,001 quando comparado ao grupo SePB. N: 8 – 10 animais por grupo.

Os dados obtidos através do TCA (Fig. 3) indicam que o pré-tratamento nos camundongos não promoveu alterações locomotoras significativas, levando em consideração que o número de cruzamentos e levantamentos foi semelhante entre os grupos.

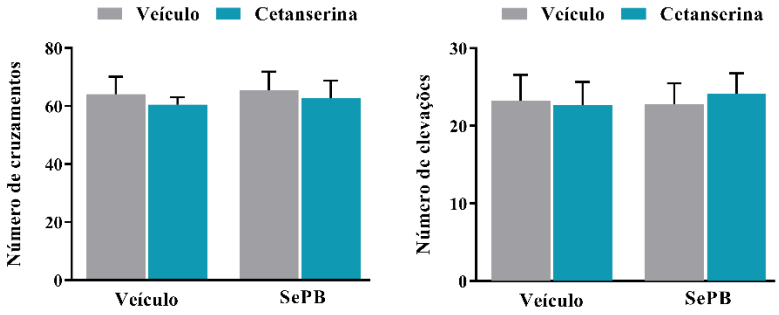


Figura 3 – Avaliação do número de cruzamentos e levantamentos durante o teste do campo aberto. N: 8 – 10 animais por grupo.

4. CONCLUSÕES

O envolvimento entre os receptores serotoninérgicos 5-HT$_{2A/2C}$ e o efeito antinociceptivo do SePB foi demonstrado a partir dos procedimentos experimentais adotados. Entretanto, é necessário explorar a interação da ação do composto com outras vias presentes no organismo, bem como a sua

toxicidade. Dessa forma, será possível estabelecê-lo como um novo alvo terapêutico para o controle da transmissão da dor.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMSTRONG, S.A.; HERR, M.J. **Physiology, Nociception**. StatPearls, 16 nov. 2019. Acessado em 10 ago. 2020 Online. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551562/#article-25912.s1.

BEAR, M.F; CONNORS, B.W; PARADISO, M.A. **Neurociências – Desvendando o sistema nervoso**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

BRÜNING, C. A.; GAI, B. M.; SOARES, S. M.; MARTINI, F.; NOGUEIRA, C. W. Serotonergic systems are implicated in antinociceptive effect of m -trifluoromethyl diphenyl diselenide in the mouse glutamate test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 125, p. 15–20, 2014.

BESCKOW, E. M.; NONEMACHER, N. T.; GARCIA, C. S.; DA SILVA ESPINDOLA, C. N. *et al.* Antidepressant-like effect of a selenopropargylic benzamide in mice: involvement of the serotonergic system. **Psychopharmacology (Berl)**, Alemanha, 2020.

JARACZ, J.; GATTNER, K, JARACZ, K.; GÓRNA, K. Unexplained Painful Physical Symptoms in Patients with Major Depressive Disorder: Prevalence, Pathophysiology and Management. **CNS Drugs**. p. 293–304, 2016.

JANSSEN, P.A.J.; NIEMEGEERS C.J.E.; DONY J.H.G.; The inhibitory effect of fentanyl and other morphine-like analgesics on the warn water induced tail withdrawal reflex in rats. **Arzeneimittelforschung**, v. 13, p. 502-507, 1963

JARACZ, J.; GATTNER, K, JARACZ, K.; GÓRNA, K. Unexplained Painful Physical Symptoms in Patients with Major Depressive Disorder: Prevalence, Pathophysiology and Management. **CNS Drugs**. p. 293–304, 2016.

LEDEBUHR, K.N.B. **Avaliação do efeito antinociceptivo da benzamida N-3-(fenilselenil) prop-2-in-1-ílica em camundongos**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Universidade Federal de Pelotas.

LOESER, J.D.; TREEDE, R.D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, Washington, v.137, p.473-477, 2008. NOGUEIRA, C. W., ZENI, G., ROCHA, J. B. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chem Rev**, 104, 6255-6285, 2004.

NOGUEIRA, C. W., ZENI, G., ROCHA, J. B. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chem Rev**, 104, 6255-6285, 2004.

WALSH, R.N.; CUMMINS, R.A.; The open-field test: A critical review. **Psychological Bulletin**, v.83, n. 3, p. 482-504, 1976.

Nogueira, C. W., G. Zeni, and J. B. Rocha. 2004. 'Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology', *Chem Rev*, 104: 6255-85.

WILHELM, E. A.; SOARES, P. S.; REIS, A. S.; BARTH, A.; FREITAS, B. G.; MOTTA, K. P. *et al.* (2019). Se - [(2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl) methyl] 4-chlorobenzoselenolate reduces the nociceptive and edematogenic response by chemical noxious stimuli in mice: implications of multi-target actions. **Pharmacological Reports,** v. 71, 1201 – 1209, 2019.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA
Graduação
PPGB Programa de Pós Graduação em Biotecnologia

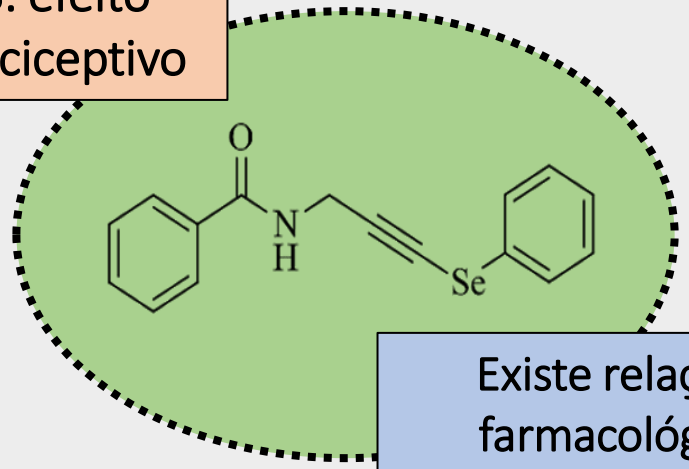
ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS 5-HT$_{2A/2C}$ NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DE UMA BENZAMIDA SELENOPROPARGÍLICA NO TESTE DE IMERSÃO DA CAUDA EM CAMUNDONGOS

GUSTAVO D'AVILA NUNES[1]; KAUANE NAYARA BAHR LEDEBUHR[1]; EVELYN MIANES BESCKOW[1]; BENHUR GODOI[2]; CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO[1]; CÉSAR AUGUSTO BRÜNING[1]



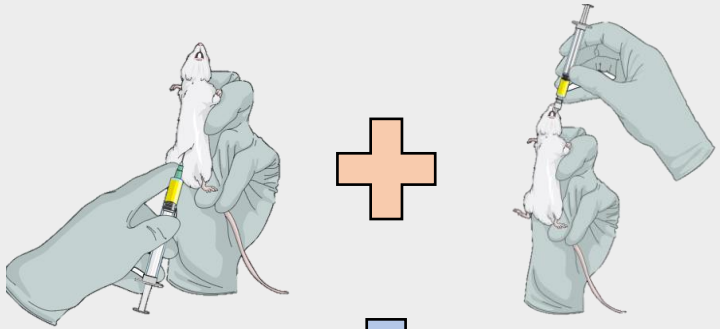
Analgésicos atuais com eficácia reduzida

SePB: efeito antinociceptivo



Existe relação da ação farmacológica com os receptores serotoninérgicos?

Cetanserina (antagonista dos receptores 5-HT$_{2A/2C}$) + SePB



Cetanserina bloqueou efeito antinociceptivo do SePB no teste da imersão da cauda.

Receptores 5-HT$_{2A/2C}$ parecem estar envolvidos no efeito do tipo antinociceptivo do SePB.

LABIONEM
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E NEUROFARMACOLOGIA MOLECULAR | UFPEL

gustavodnunes@gmail.com

COMPARAÇÃO ENTRE O EFEITO CITOTÓXICO DO ÁCIDO TÂNICO E ÁCIDO GÁLICO FRENTE À LINHAGEM DE GLIOBLASTOMA DE RATO

JULIANE TORCHELSEN SARAIVA[1]; NATÁLIA PONTES BONA[2]; NATHALIA STARK PEDRA[3]; KARINA PEREIRA LUDUVICO[4]; ROSELIA MARIA SPANEVELLO[5]; FRANCIELI MORO STEFANELLO[6]

[1]Universidade Federal de Pelotas – julianetorchelsen@gmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas – nataliapbona@gmail.com
[3]Universidade Federal de Pelotas – nathaliastark@hotmail.com
[4]Universidade Federal de Pelotas – karina_luduvico@outlook.com
[5]Universidade Federal de Pelotas – rspanevello@gmail.com
[6]Universidade Federal de Pelotas – fmstefanello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O glioblastoma multiforme (GBM) é um tipo de tumor cerebral agressivo que apresenta alta malignidade, sendo classificado como glioma de grau IV, exibindo altas taxas de infiltração, vascularização e de crescimento (LOUIS et al., 2016; GIAKOUMETTIS et al., 2018). Os indivíduos acometidos pelo GBM têm um baixo prognóstico, com uma média de sobrevida em torno de 12-15 meses, e o tratamento atual consiste em cirurgia, além de radioterapia combinada ao quimioterápico temozolomida (TMZ); entretanto, na maioria dos casos, essas combinações terapêuticas são insuficientes (SHABIERJIANG et al., 2018).

Levando em conta a alta taxa de mortalidade dos pacientes acometidos por essa doença, é de extrema importância que se busque por terapias alternativas, a fim de oferecer uma melhora na qualidade de vida dos portadores. Nesse sentido, destacam-se os compostos naturais, que são amplamente relatados na literatura por possuírem diversas propriedades farmacológicas, incluindo atividade antitumoral frente ao GBM (BHUSHAN & DESAI, 2017). Sendo assim, o ácido tânico (AT) é um tanino hidrolisável que possui diversas propriedades relatadas, inclusive inibição da proliferação células de câncer de mama (BRIDGEMAN et al., 2017). Além do AT, o ácido gálico (AG) é um polifenol que também exerce atividades farmacológicas, dentre elas antitumoral (LOCATELLI et al., 2013). Considerando o exposto, o objetivo desse trabalho foi realizar uma comparação entre o efeito antitumoral do AT e do AG frente à linhagem celular C6 de glioblastoma multiforme (GBM) *in vitro.*

2. METODOLOGIA

2.1 Cultivo de linhagem de GBM e cultivo primário de astrócitos

A linhagem de glioma (C6) foi obtida através da *American Type Culture Collection* (ATCC), cultivada em meio DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e mantida sob condições padrão de cultivo celular (37ºC de temperatura, ambiente umidificado e 5% de CO_2). As células foram semeadas em placa de 96 poços na densidade de 5 x 10^3 células/poço. Para realizar o cultivo primário de astrócitos, foram utilizados seis ratos *Wistar*, com idades de 1 a 3 dias. Esse procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em

Experimentação Animal (CEEA) da UFPel, sob o número de protocolo 31292-2018. O cultivo foi realizado de acordo com DA FROTA et al. (2009), onde os astrócitos provenientes do córtex dos ratos foram mantidos em meio DMEM, suplementado com 10% de SFB. As células foram semeadas em placa de 96 poços, com uma densidade de 3 x 10^4 células/poço e foram mantidas sob condição padrão de cultivo celular por 15 dias.

2.2 Avaliação da citotoxicidade celular do AT frente ao GBM e à cultura primária de astrócitos

As células foram tratadas com o AT nas concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50 e 75 µM no período de 48 horas, sendo utilizadas células expostas ao DMSO (0,05%) como controle. A viabilidade das células C6 foi avaliada através do método de MTT, que consiste na determinação de células com metabolismo viável (MOSMMAN, 1983). O meio foi removido após o tratamento e a solução de MTT misturada com DMEM (0,5 mg/mL) foi adicionada. As células foram incubadas por 90 minutos sob condição padrão de cultivo celular. Além disso, foi realizado o método colorimétrico da sulforodamina B (SRB) para avaliar a proliferação celular das células C6 e dos astrócitos, baseado na capacidade de ligação do corante aos aminoácidos das proteínas celulares (PAUWELS et al., 2003). O meio foi removido após o tratamento com AT, adicionou-se 50% de ácido tricloroacético para fixar as células e incubou-se a 4ºC por 45 min. Por fim, o corante foi adicionado às células C6 e aos astrócitos e a incubação ocorreu no escuro por 30 minutos à temperatura ambiente.

2.3 Avaliação da citotoxicidade celular do AG frente ao GBM e à cultura primária de astrócitos

As células foram tratadas com AG nas concentrações de 50; 100; 200; 300 e 400 µM no período de 48 horas, sendo utilizado como controle células não tratadas. Da mesma forma, foram realizados os métodos de MTT e SRB para avaliar a viabilidade e a proliferação celular, respectivamente, das células C6 frente ao AG, além da avaliação da proliferação celular dos astrócitos pelo ensaio de SRB.

2.4 Análise estatística

Os dados foram expressos como média ± erro padrão e analisados por ANOVA de uma via seguido de *post-hoc* de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando P <0,05.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que o AT reduziu a proliferação celular do GBM nas concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50 e 75 µM em 21%, 26%, 40%, 45% e 51%, respectivamente, após 48 h de exposição ao tratamento, quando comparado ao controle (Figura 1A). Adicionalmente, reduziu a viabilidade celular nas mesmas concentrações em 10%, 17%, 28%, 36% e 44%, respectivamente, após 48 h de exposição ao tratamento, quando comparado ao controle (Figura 1B).

Em relação aos resultados referentes ao AG, pode-se observar que exerceu um efeito antiproliferativo ao GBM nas concentrações de 200, 300 e

400 µM através da redução da proliferação celular em 39%, 59% e 64%, respectivamente, após 48 h de exposição ao tratamento, quando comparado ao controle (Figura 2A). Além disso, o AG também foi capaz de reduzir a viabilidade celular do GBM nas concentrações de 200, 300, e 400 µM em 27%, 35% e 52%, respectivamente, quando comparado ao controle, como demonstrado na Figura 2B.

Quanto aos efeitos citotóxicos sobre o cultivo primário de astrócitos (Figura 3A e 3B), observou-se que ambos os tratamentos com AT ou AG não promoveram qualquer alteração significativa na proliferação ou na viabilidade celular, sugerindo efeito citotóxico seletivo frente ao GBM.

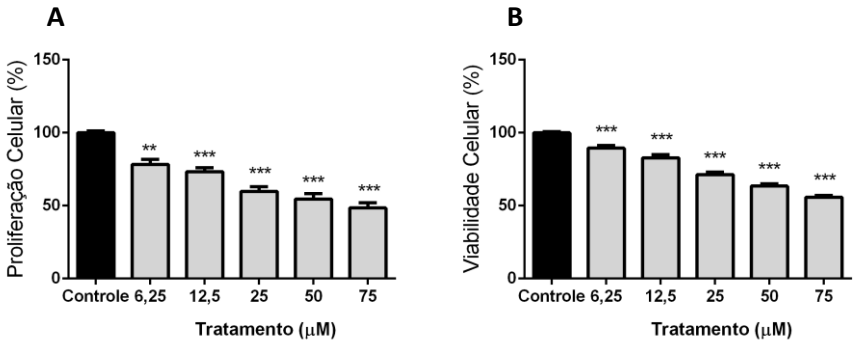


Figura 1. Análise da proliferação (A) e da viabilidade (B) do AT em linhagem de GBM de ratos (C6), após 48 h de tratamento. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido de *post-hoc* de Tukey. ** *P* <0,01 e *** *P* <0,001 quando comparado ao grupo controle.

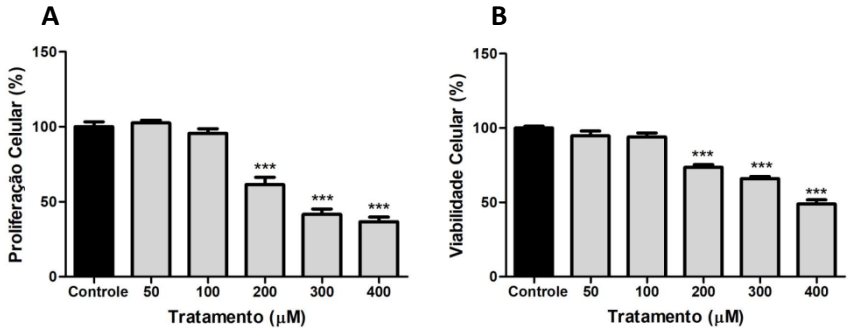


Figura 2. Análise da proliferação (A) e da viabilidade (B) do AG em linhagem de GBM de ratos (C6), após 48 h de tratamento. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido de *post-hoc* de Tukey. *** *P* <0,001 quando comparado ao grupo controle.

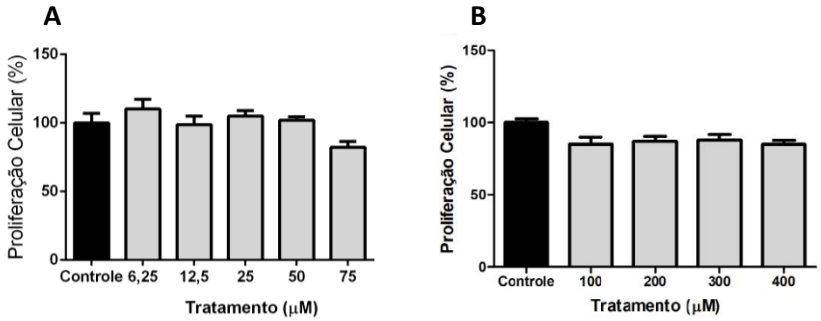


Figura 3. Análise da proliferação celular do AT (A) e do AG (B) em cultivo primário de astrócitos. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido de *post-hoc* de Tukey.

4. CONCLUSÕES

Ambos compostos promoveram um efeito antiglioma, e podemos inferir que o AT demonstrou um efeito mais promissor em comparação ao AG, pois apesar das porcentagens de redução do AG serem maiores, o AT foi administrado em menores concentrações comparadas às de AG, e isso pode estar relacionado com as diferenças estruturais dos compostos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BHUSHAN, A.; DESAI, V. Natural Bioactive Compounds: Alternative Approach to the Treatment of Glioblastoma Multiforme. **Hindawi**, v. 2017, p. 1 – 10, 2017.

BRIDGEMAN, C.; NGUYEN, T.; KISHORE, V. Anticancer efficacy of tannic acid is dependent on the stiffness of the underlying matrix. **Journal of Biomaterials Science Polymer Edition**, v. 29, n. 4, p. 412 – 427, 2018.

DA FROTA, M. L. J. et al. Brazilian marine sponge Polymastia janeirensis induces apoptotic cell death in human U138MG glioma cell line, but not in a normal cell culture. **Investigational New Drugs**, v. 27, p. 13-20, 2009.

GIAKOUMETTIS, D.; KRITIS, A.; FOROGLOU, N. C6 cell line: the gold standard in glioma research. **Hippokratia**, v. 22, n. 3, p. 105 – 122.

LOCATELLI, C.; FILIPPIN MONTEIRO, F. B.; CRECZYNSKI PASA, T. B. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, p. 233-239, 2013.

LOUIS, N. et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803 - 820, 2016.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

PAUWELS, B. et al. Comparison of the sulforhodamine B assay and the clonogenic assay for in vitro chemoradiation studies. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 51, p. 221-226, 2003.

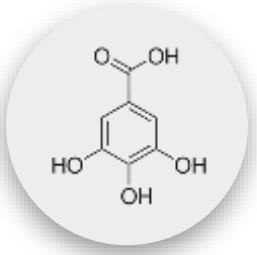
SHABIERJIANG, J. et al. Potential Strategies Overcoming the Temozolomide Resistance for Glioblastoma. **Neurologia-medico chirurgica**, Tokyo, v. 58, p. 405 – 421, 2018.

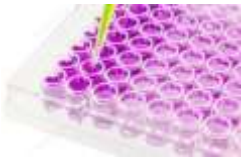
VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

COMPARAÇÃO ENTRE O EFEITO CITOTÓXICO DO ÁCIDO TÂNICO E ÁCIDO GÁLICO FRENTE À LINHAGEM DE GLIOBLASTOMA DE RATO

JULIANE TORCHELSEN SARAIVA[1]; NATÁLIA PONTES BONA[2]; NATHALIA STARK PEDRA[3]; KARINA PEREIRA LUDUVICO[4]; ROSELIA MARIA SPANEVELLO[5]; FRANCIELI MORO STEFANELLO[6]

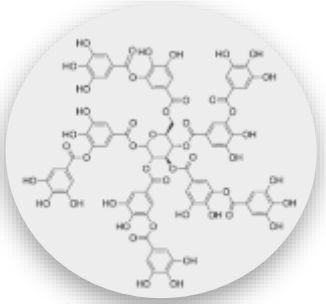
AG ⬇ a proliferação e a viabilidade do GBM



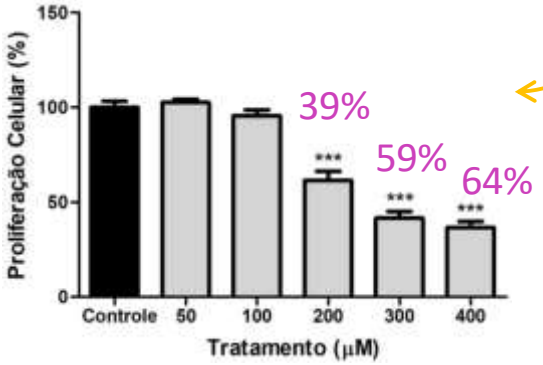


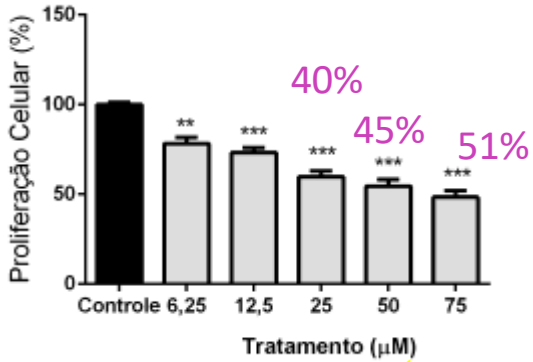
Células de GBM (C6)

Ensaios:
SRB e MTT

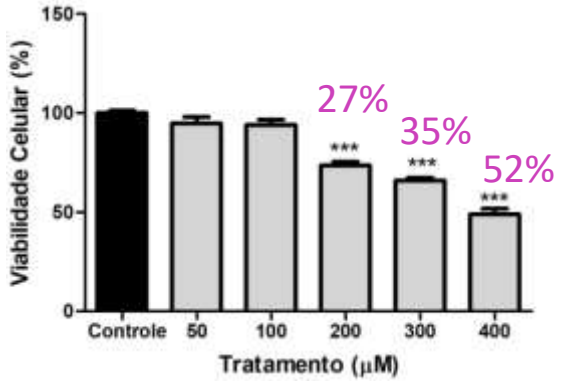


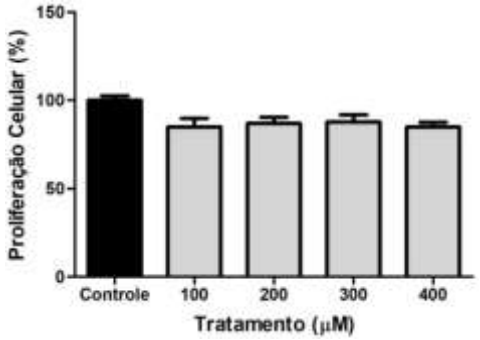
AT ⬇ a proliferação e a viabilidade do GBM

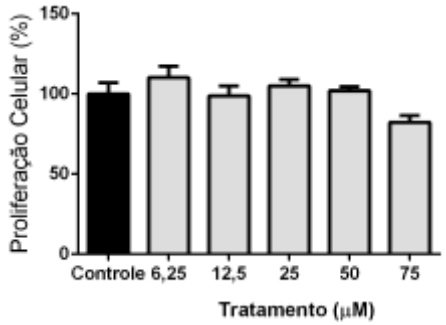


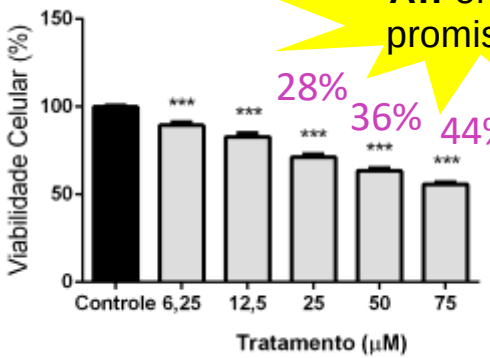


Sem alterações significativas nos astrócitos:
Citotoxicidade seletiva frente ao GBM em ambos tratamentos no **teste de SRB**









AT: efeito + promissor ?

EFEITOS DA INOSINA NO STATUS REDOX CEREBRAL DE RATOS EM UM MODELO DE DÉFICIT DE AQUISIÇÃO DE MEMÓRIA INDUZIDO POR ESCOPOLAMINA

KELEN GOULARTE[1]; FERNANDA CARDOSO TEIXEIRA[2]; JULIANE CARDOSO[2]; KARINA LUDUVIDO[2]; JULIA MELLO[2]; ROSELIA MARIA SPANEVELLO[3]

[1]Universidade Federal de Pelotas – kelenqf@gmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas – fe.t@hotmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas – ju.souza591@gmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas – karina.luduvico@outlook.com
[2]Universidade Federal de Pelotas – julia.eisenhardt@hotmail.com
[3]Universidade Federal de Pelotas – rspanevello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é uma patologia neurodegenerativa associada com perda da memória (AGOSTINHO et al., 2010). A memória pode ser dividida em três fases: aquisição, consolidação e evocação. A fase de aquisição é caracterizada pela chegada de informação ao sistema nervoso central (MOURÃO-JUNIOR & FARIA, 2015).

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a remoção destas espécies pelas defesas antioxidantes (HALLIWELL, 2006). Alterações no status redox podem causar danos em lipídios, proteínas e DNA comprometendo o funcionamento celular e dos neurônios levando assim a déficits relacionados, por exemplo, a mémoria (AGOSTINHO et al., 2010).

A inosina é um nucleosídeo formado pela desaminação da adenosina, que tem apresentado efeitos neuroprotetores por modular o status redox, a inflamação e processos relacionados a memória (RUHAL & DHRINGA, 2018; TEIXEIRA et al., 2020). Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a capacidade da inosina em proteger contra os déficits na aquisição de memória e danos oxidativos cerebrais induzidos pela escopolamina em ratos.

2. METODOLOGIA

2.1 Protocolo experimental e teste da esquiva inibitória:

Quarenta ratos machos Wistar adultos foram divididos em quatro grupos: Controle (C), escopolamina (SCO), escopolamina + inosina 50 mg/kg (SCO + INO 50 mg/kg) e escopolamina + inosina 100 mg/kg (SCO + INO 100 mg/kg). Os animais foram tratados durante 7 dias por via intraperitoneal (i.p) com inosina ou salina. Para avaliar a fase do aprendizado/aquisição da memória, no 8º dia os animais receberam SCO (1mg/kg i.p.) uma hora antes do treino do teste da esquiva inibitória. A sessão de treino da esquiva inibitória foi realizada em um aparato que consistia em uma caixa com um piso de grade com uma porção coberta por uma plataforma de 7×25 cm, com 2,5 cm de altura.

Cada rato foi colocado na plataforma e quando ele desceu com as quatro patas uma estimulação elétrica de 3 s/ 0,5mA foi aplicada. Cada animal foi submetido ao teste 24 horas após o treino, sendo cronometrado o tempo que o animal levou para descer da plataforma (latência). Protocolo adaptado de Gutierres et al. (2012) e as doses de inosina foram escolhidas com base em estudos anteriores de nosso laboratório (TEIXEIRA et al., 2020). Após, os animais foram submetidos à eutanásia e o hipocampo e córtex cerebral foram coletados (CEEA 4808/2017).

2.2 Análise de Parâmetros de estresse oxidativo:

O córtex cerebral e o hipocampo foram homogeneizados em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7,4) e centrifugados a 3500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado para as análises dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) (ALI et al., 1992) e atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) (MISRA & FRIDOVICH, 1972) e catalase (CAT) (AEBI, 1984).

2.3 Análise Estatística:

Os resultados da esquiva inibitória foram analisados pelo teste de Kruskal Walis e expressos como mediana ± intervalo interquartil. Os resultados do estresse oxidativo foram analisados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste post hoc de Tukey e expressos como média ± erro. A diferença estatística foi considerada com $P \leq 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A SCO causou um déficit na aquisição da memória, o que pode ser comprovado pela diminuição da latência do grupo SCO, quando comparado ao controle. O tratamento com inosina não foi capaz de prevenir este efeito (Figura 1).

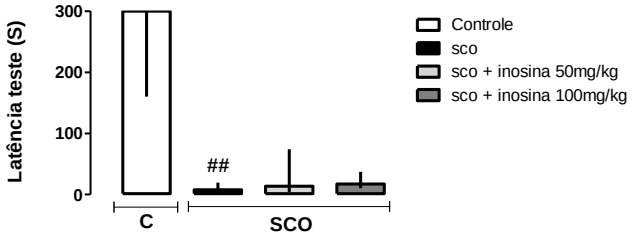


Figura 1. Efeito da inosina (50 e 100 mg/kg) em um protocolo de défict na aquisição da memória induzida por SCO (1 mg /kg) avaliado pela tarefa da esquiva inibitória. A latência é expressa em segundos (s). ## P <0,01 representa diferença em relação ao grupo C.

Observa-se que a SCO foi capaz de aumentar os níveis de ERO no hipocampo e córtex cerebral. O tratamento com inosina em ambas as doses foram capazes de prevenir esse aumento (Figura 2). Em relação as enzimas antioxidantes, a escoplamina diminuiu a atividade da SOD em hipocampo e córtex cerebral e apenas diminuiu a atividade da CAT em cortex cerebral. O tratamento com a inosina em ambas as doses foi capaz de prevenir a

diminuição da atividade da SOD em hipocampo, não prevenindo a alteração em córtex cerebral. Ainda, a inosina só preveniu a alteração na enzima CAT no córtex cerebral na maior concentração testada (Figura 3).

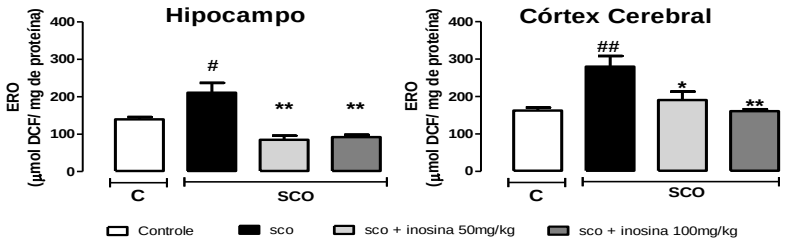


Figura 2: Efeito da inosina (50 e 100 mg/kg) nos níveis de ERO em hipocampo e córtex cerebral de ratos submetidos a um modelo de déficit de memória induzido por SCO. #P <0,05 e ## P <0,01 indicam diferença em relação so grupo C. * P <0,05, ** P <0,01 e *** P <0,001 indicam diferença em relação ao grupo SCO.

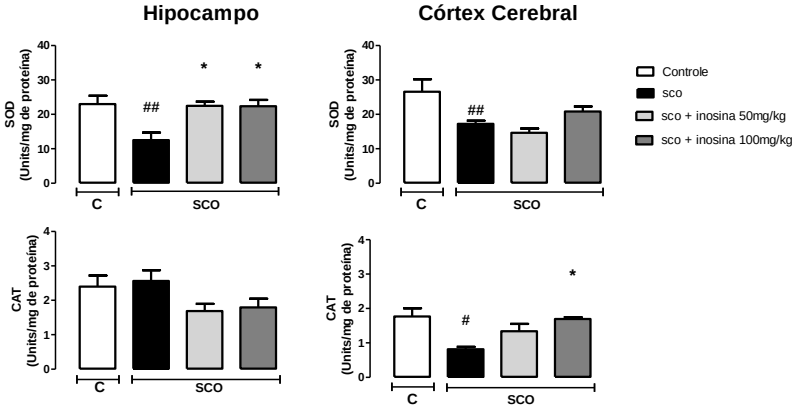


Figura 3: Efeito da inosina (50 e 100 mg / kg) na atividade da SOD e da CAT no hipocampo no córtex cerebral de ratos submetidos a um modelo de déficit de memória induzido por SCO. #P <0,05 e ## P <0,01 indicam diferença em relação ao grupo C. * P<0,05 indica diferença quando comparado ao grupo SCO.

A produção excessiva de ERO associada à diminuição das defesas antioxidantes em córtex cerebral e hipocampo poderia explicar os déficits relacionados a aquisição da memória induzido pela SCO. Entretanto, considerando que a inosina foi capaz de prevenir alterações no status redox, mas não os déficits de aquisição de memória, nossos dados sugerem que outros mecanismos, além do dano oxidativo, podem estar envolvidos no prejuizo da memória observado neste trabalho.

4. CONCLUSÕES

A inosina não foi capaz de prevenir os déficits na aquisição de memória induzida por SCO, porém esta molécula foi capaz de prevenir as alterações no status redox em hipocampo e córtex cerebral de ratos submetidos a um modelo de amnésia. Estudos adicionais são necessários para avaliar o potencial terapêutico da inosina para o tratamento de doenças neurodegenerativas, bem como outros mecanismos, além do dano oxidativo, que podem estar envolvidos no prejuizo da memória.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, Hugo. [13] Catalase in vitro. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1984. p. 121-126.

AGOSTINHO, Paula; CUNHA, Rodrigo; OLIVEIRA, Catarina. Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Current pharmaceutical design**, v. 16, n. 25, p. 2766-2778, 2010.

ALI, S. F.; LEBEL, C. P.; BONDY, S. C. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 13, n. 3, p. 637-648, 1992.

GUTIERRES, Jessié M. et al. Protective effects of anthocyanins on the ectonucleotidase activity in the impairment of memory induced by scopolamine in adult rats. **Life Sciences**, v. 91, n. 23-24, p. 1221-1228, 2012.

JÚNIOR, Carlos Alberto Mourão; FARIA, Nicole Costa. Memory. **Psicologia, Reflexão e Crítica**, v. 28, n. 4, p. 780, 2015.

HALLIWELL, Barry. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now. **Journal of neurochemistry**, v. 97, n. 6, p. 1634-1658, 2006.

MISRA, Hara P.; FRIDOVICH, Irwin. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170-3175, 1972.

RUHAL, Poonam; DHINGRA, Dinesh. Inosine improves cognitive function and decreases aging-induced oxidative stress and neuroinflammation in aged female rats. **Inflammopharmacology**, v. 26, n. 5, p. 1317-1329, 2018.

TEIXEIRA, Fernanda Cardoso et al. Inosine protects against impairment of memory induced by experimental model of Alzheimer disease: a nucleoside with multitarget brain actions. **Psychopharmacology**, v. 237, n. 3, p. 811-823,2020.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA
Pós-Graduação
PPGB

EFEITOS DA INOSINA NO STATUS REDOX CEREBRAL DE RATOS EM UM MODELO DE DÉFICIT DE AQUISIÇÃO DE MEMÓRIA INDUZIDO POR ESCOPOLAMINA

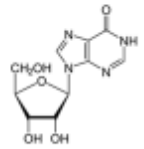
KELEN GOULARTE[1]; FERNANDA CARDOSO TEIXEIRA[2]; JULIANE CARDOSO[2]; KARINA LUDUVIDO[2]; JULIA MELLO[2]; ROSELIA MARIA SPANEVELLO[3]



Doença de Alzheimer causa neurodegeneração



ESTRESSE OXIDATIVO - Aumento de ERO diminui as defesas antioxidantes



TRATAMENTO inosina 50 mg/kg ou 100mg/kg , durante 7 dias, 1 X dia, IP



MODELO ANIMAL AMNÉSIA- Ratos Wistar machos com 60 dias, 1 adm escopolamina 1mg/kg via ip



Inosina apresenta potencial antioxidante em modelo de animal de amnésia

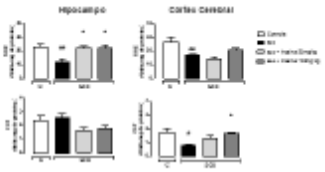


Fig. 3: Efeito da inosina (50 e 100 mg / kg) na atividade da (SOD) e (CAT)

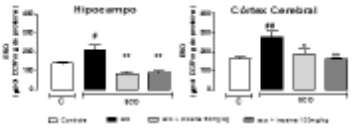


Fig. 2: Efeito da inosina nos níveis de ERO em hipocampo e córtex cerebral

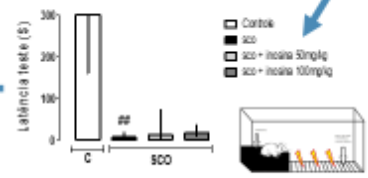


Fig. 1: Efeito da inosina no teste comportamental esquiva inibitória

EFEITO CITOTÓXICO SELETIVO DO EXTRATO DE MIRTILO EM LINHAGEM DE GLIOBLASTOMA C6

LARISSA MENEZES DA SILVEIRA[1]; NATHALIA STARK PEDRA[2]; NATÁLIA PONTES BONA [2], LUIZA SPOHR[2], ROSELIA MARIA SPANEVELLO[2]; MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES[3]

[1]Universidade Federal de Pelotas – larissamenezes1999@gmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas – nathaliastark@hotmail.com
[3]Universidade Federal de Pelotas – mspereirasoares@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O glioblastoma (GB) é um tumor cerebral maligno grave, pois apresenta comportamento agressivo e diversas vezes baixa resposta ao tratamento oncológico (SANTOS et al., 2019). De acordo com a Organização Mundial da Saúde o GB é classificado como um tumor difuso de grau IV considerando sua capacidade de infiltração nos tecidos circundantes, de angiogênese, e devido à presença de necrose e resistência ao tratamento (JOHNSON; GIANNINI; KAUFMANN, 2020). Ademais, este tipo de tumor conta com uma taxa de sobrevida estimada bastante baixa, em torno de 12 a 15 meses, principalmente devido à associação de sua agressividade e limitação de terapêutica (WEN; KESARI, 2008).

Desta forma, a busca por tratamentos alternativos têm sido amplamente investigada. Estudos epidemiológicos relataram um efeito protetor do consumo de frutas vermelhas na incidência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como o câncer (MANGANARIS et al., 2013). Neste grupo de frutas encontra-se o mirtilo (*Vaccinium virgatum*) que apresenta composição rica em fitoquímicos do tipo fenólico, os quais possuem propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e anticarcinogênicas já estabelecidas (SEERAM, 2008).

O alto poder antioxidante do mirtilo lhe fez ficar conhecido como o “fruto da longevidade” (REQUE, 2012), principalmente devido a sua capacidade em inibir a degradação oxidativa por ação de radicais livres ou outras espécies reativas (SANTOS et al., 2007). Ainda, tal propriedade confere fator protetor perante a incidência de DCNT, como os gliomas, devido à relação intrínseca do estresse oxidativo tanto com o desenvolvimento quanto com a malignidade e reincidência destas doenças (REQUE, 2012).

Dessa forma, levando em consideração o potencial antioxidante do mirtilo, bem como a relação intrínseca do estresse oxidativo com a ocorrência de cânceres, além dos relatos já existentes quanto ao seu potencial anti-inflamatório e anticancerígeno em câncer de próstata (DIAS, 2016), este trabalho apresenta como objetivo a investigação do potencial antitumoral do extrato etanólico de mirtilo frente à linhagem de glioma de rato C6.

2. METODOLOGIA

2.1 Cultivo glioma C6

As células de glioma de rato C6 foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, EUA). As células foram cultivadas em meio

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e então mantidas em estufa a 37°C contendo 5% de CO_2.

2.2 Cultura primária de astrócitos

Para a realização das culturas de astrócitos, utilizaram-se ratos machos *Wistar* com idade de 1-2 dias. Os animais foram submetidos à eutanásia e o córtex cerebral foi isolado, homogeneizado e o *pool* de células centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos, em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células ressuspendido em meio DMEM suplementado com 10% de SFB (pH 7,6). Os astrócitos foram semeados em uma densidade de 3×10^4 células por poço em placas de 96 poços previamente preparadas com poli-L-lisina. As trocas de meio foram realizadas a cada 5 dias até a maturação celular (15-20 dias). As células foram cultivadas sob condições de temperatura (37°C), concentração de CO_2 (5%) e umidade controladas (GOTTFRIED et al., 1999). Cabe salientar que este protocolo foi previamente aprovado pelo cômite de ética em experimentação animal, da UFPel (CEEA 31292-2018).

2.3 Tratamento com extrato de mirtilo - concentrações e tempos de exposição

O extrato de frutos de mirtilo foi preparado utilizando a metodologia descrita por Bordignon et al. (2009). Inicialmente, o extrato de mirtilo foi dissolvido em água estéril na concentração de 100 µg/mL (solução estoque) e então diluído em DMEM com 10% SFB para obter as concentrações de 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 600 µg/mL. Após as células de linhagem C6 foram semeadas em placas de 96 poços em uma densidade de $5x10^3$ e tratadas com extrato de mirtilo nas concentrações de 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 600 µg/mL por 24 h, 48 h e 72 h. Os astrócitos foram tratadas com o extrato de mirtilo (500-600 µg/mL) por 72 h. Após os tratamentos, a viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT. Células expostas somente ao meio DMEM foram consideradas controle.

2.4 Teste de viabilidade celular (MTT)

Após o protocolo experimental nas placas de 96 poços, estas foram gentilmente lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) e, em seguida, foram adicionados 50 µL de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (0,5 mg/mL) por poço. Posteriormente, as células foram incubadas em estufa a 37°C e em atmosfera com 5% de CO2 durante 90 minutos. Por fim, o MTT foi removido e o precipitado formado eluído com 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). A leitura das absorbâncias se realizou em leitor de microplacas, utilizando-se o comprimento de onda de 492 nm.

2.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. Foi considerada diferença significativa quando $p<0,05$. Os dados foram expressos com média±erro padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi realizada a avaliação da viabilidade celular através de ensaio de MTT em três tempos diferentes, onde todos os grupos celulares tratados foram

comparados ao grupo controle. Os dados obtidos expressos nos gráficos abaixo (Figura 1) demonstram que após um tempo de 24 h houve redução significativa na viabilidade celular nos grupos tratados com o extrato de mirtilo a partir da concentração de 400 µg/mL e após 48 h e 72 h houve uma redução significativa na viabilidade celular a partir da concentração de 200 µg/mL.

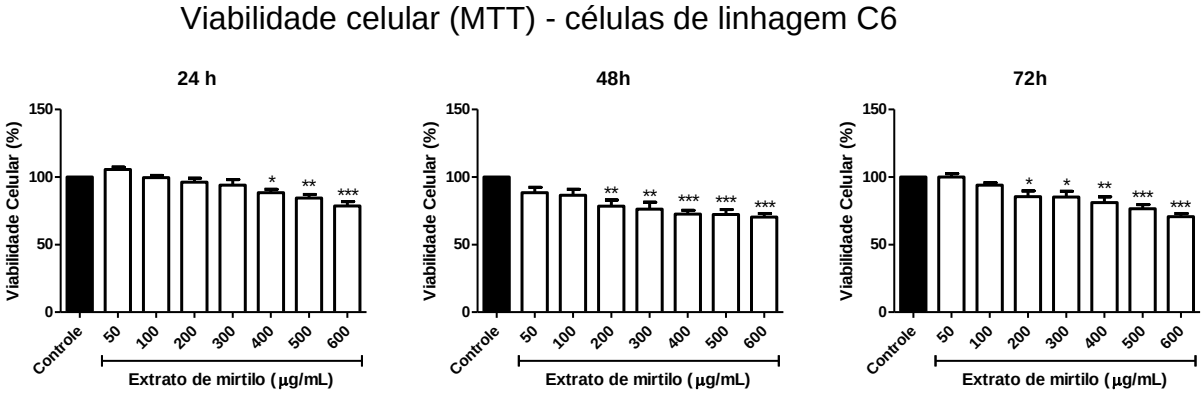


Figura 1. Efeito do tratamento com extrato de mirtilo (50-600 µg/mL) em células de glioblastoma C6, após exposição durante 24 h, 48 h e 72 h. Dados estão expressos com percentagem do controle. *****p< 0,05; ******p<0,01; ***p<0,001 comparado com as células controles.

Ademais, foi possível observar que as culturas celulares de astrócitos tratadas com 500-600 µg/mL do extrato de mirtilo, não demonstraram alteração significativa de viabilidade celular após 72 h (**Figura 2**).

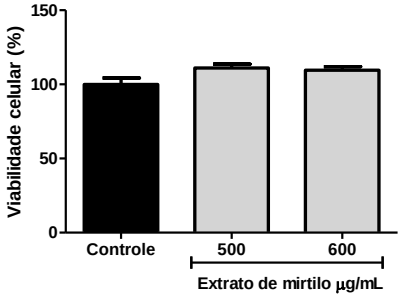


Figura 2. Efeito do tratamento com extrato de mirtilo (500 e 600 µg/mL) em cultura primária de astrócitos após exposição de 72 h.

A partir dos dados acima, percebe-se que o extrato de mirtilo atuou de forma seletiva ao diminuir a viabilidade das células de glioblastoma C6 sem comprometer o a viabilidade dos astrócitos. Essa seletividade é de extrema importância uma vez que quimioterápicos antineoplásicos usuais geralmente acometem também células saudáveis ocasionando efeitos os colaterais indesejados (ANDRADE; SILVA, 2007).

Cabe salientar que o extrato de mirtilo utilizado neste trabalho, é rico em antocianinas (DEBOM et al., 2016), e que estas poderiam estar contribuindo de forma significativa para a redução da viabilidade das células de glioblastoma-C6. Este efeito já foi descrito por Zhao et al. (2019), que demonstraram que as antocianinas são capazes de reduzir a viabilidade celular e induzir morte celular por apoptose de células de câncer de cólon retal.

4. CONCLUSÕES

Considerando o que foi proposto os resultados obtidos até o momento, pode-se considerar que o extrato de mirtilo apresenta potencial antineoplásico frente a linhagem de gliobastoma C6 além de não causar citotoxicidade em células saudáveis de astrócitos. Essas dados, suportam estudos futuros para o entendimento dos mecanismos de ação do extrato de mirtilo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, M. DE; SILVA, S. R. DA. Administração de quimioterápicos: uma proposta de protocolo de enfermagem. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 60, n. 3, p. 331–335, 2007.

BORDIGNON, C. L. et al. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 183–188, jan. 2009.

DEBOM, G. et al. Preventive effects of blueberry extract on behavioral and biochemical dysfunctions in rats submitted to a model of manic behavior induced by ketamine. **Brain Research Bulletin**, v. 127, p. 260–269, 2016.

DIAS, K. E. **Avaliação da atividade antimicrobiana , imunomoduladora e anticancerígena de extratos de mirtilo e de framboesa**. 2016. Dissertação (Mestrado em Controle da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos) Universidade de Lisboa.

GOTTFRIED, C. et al. Regulation of protein phosphorylation in astrocyte cultures by external calcium ions: Specific effects on the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin and heat shock protein 27 (HSP27). **Brain Research**, v. 833, n. 2, p. 142–149, 3 jul. 1999.

JOHNSON, D. R.; GIANNINI, C.; KAUFMANN, T. J. Review of WHO 2016 Changes to Classification of Gliomas; Incorporation of Molecular Markers. In: **Glioma Imaging**. [s.l.] Springer International Publishing, 2020. p. 127–138.

MANGANARIS, G. A. et al. **Berry antioxidants: Small fruits providing large benefitsJournal of the Science of Food and Agriculture**, 2013.

REQUE, P. M. **Frutos de mirtilo (Vaccinium spp.) e produtos derivados: caracterização e estabilidade de suas propriedades bioativas**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

SANTOS, M. H. DOS et al. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (Coffea arabica). **Quimica Nova**, v. 30, n. 3, p. 604–610, 2007.

SANTOS, M. et al. **Diretrizes oncológicas 2**. São Paulo: Doctor Press Ed. Científica, 2019.

SEERAM, N. P. Berry fruits: Compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 627–629, 2008.

WEN, P. Y.; KESARI, S. Malignant Gliomas in Adults. **The New England journal of medicine**, p. 492–507, 2008.

ZHAO, X. et al. The Prevention and Inhibition Effect of Anthocyanins on Colorectal Cancer. **Current Pharmaceutical Design**, v. 25, n. 46, p. 4919–4927, 13 dez. 2019.

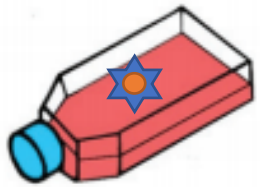
VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

EFEITO CITOTÓXICO SELETIVO DO EXTRATO DE MIRTILO EM LINHAGEM DE GLIOBLASTOMA C6

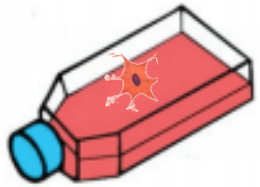
LARISSA MENEZES DA SILVEIRA[1]; NATHALIA STARK PEDRA[2], NATÁLIA PONTES BONA[2],
LUIZA SPOHR[2], ROSELIA MARIA SPANEVELLO[2], MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES[3]

Extrato de mirtilo - *Vaccinium virgatum*
Concentrações:
I) 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 600 µg/mL
II) 500 e 600 µg/mL



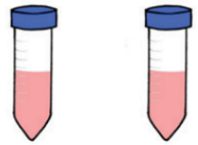


Glioblastoma C6



Astrócitos
(CEEA 31292-2018)



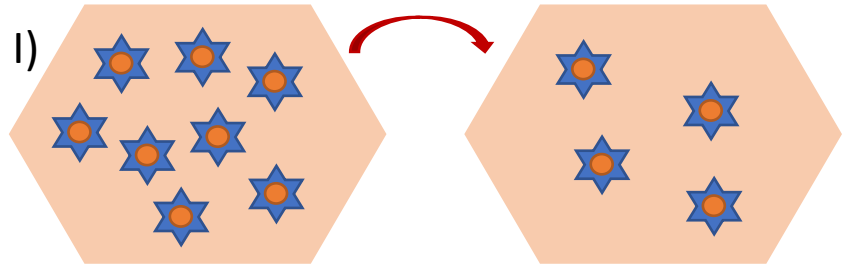




Teste de viabilidade celular (MTT)

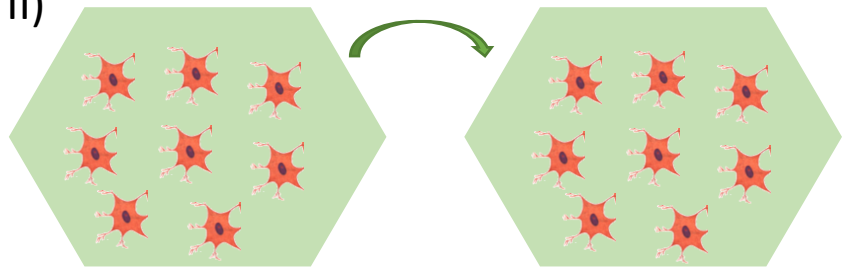
- 24 h
- 48 h
- 72 h

I)



Glioblastoma C6
↓Redução da viabilidade

II)



Astrócitos
✓Sem alteração da viabilidade

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E DO POSSÍVEL ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES β-ADRENÉRGICOS NO EFEITO DO TIPO ANTIDEPRESSIVO DO COMPOSTO 2-FENIL-3-(FENILSELANIL)BENZOFURANO EM CAMUNDONGOS SWISS MACHOS

LETÍCIA DEVANTIER KRÜGER[1]; DIANER NORNBERG STRELOW[2]; LUIZ ROBERTO CARRARO JÚNIOR[2];TAÍS DA SILVA TEIXEIRA RECH[2]; CÉSAR AUGUSTO BRÜNING[2]; CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO[3]

[1,2,3]Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM) – leticiadevantier@hotmail.com; dianer_strelow@hotmail.com; luizrobertocarraro@hotmail.com; taisteixeira.r@gmail.com; cabruning@yahoo.com.br; cbortolatto@gmail.com.

1. INTRODUÇÃO

Uma das doenças mais comuns quando se fala em limite funcional psicossocial e diminuição da qualidade de vida é a depressão (MALHI e MANN, 2018). Embora sua fisiopatologia não seja ainda completamente elucidada, a desregulação do sistema noradrenérgico tem sido implicada na patogênese desta doença (SEKY et al., 2018), uma vez que este faz parte da teoria monoaminérgica que relaciona a diminuição de noradrenalina, serotonina e dopamina aos sintomas depressivos (ABREU et al., 2018).

Diversas classes de compostos vêm sendo estudadas como potenciais tratamentos para a depressão, dentre estes os compostos a base de selênio mostraram-se bastante promissores (CASARIL et al., 2019). Em contrapartida, pesquisadores já relataram que uma superexposição ao selênio provoca efeitos adversos à saúde, pois seu nível de toxicidade pode estar relacionado a sua forma química já que espécies inorgânicas e orgânicas possuem propriedades biológicas distintas (VINCETI et al.,2018). Os compostos orgânicos, por sua vez, parecem possuir menor toxicidade e uma melhor biodisponibilidade que os inorgânicos (VENTURA et al., 2017).

Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar o possível envolvimento da via noradrenérgica na ação do tipo antidepressiva do composto 2-fenil-3-(fenilselanil)benzofurano (SeBZF**1**) no teste de suspensão pela cauda (TSC) bem como avaliar o seu potencial de toxicidade aguda.

2. METODOLOGIA

2.1 Animais e síntese química do composto

Foram utilizados camundongos Swiss machos pesando entre 25-35 g. Os estudos foram realizados de acordo com os protocolos aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas sob o código 4897. A síntese do composto SeBZF**1** foi realizada pelo Laboratório de Síntese de Derivados de Selênio e Telúrio (LabSelen) da Universidade Federal de Santa Catarina.

2.2 Análise estatística

O software GraphPad Prism versão 8.2.0 foi utilizado para a análise estatística dos dados. As comparações entre os grupos foram realizadas por

ANOVA de uma ou duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. Para o teste de toxicidade utilizou-se o teste t não pareado. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M) e valores de $p<0,05$ foram considerados significativos.

2.3 Investigação do possível envolvimento da via noradrenérgica no efeito do tipo antidepressivo do SeBZF1 em camundongos Swiss machos

Os camundongos foram pré-tratados com propanolol (2 mg/kg, intraperitonial, i.p) , um antagonista não seletivo dos receptores β adrenérgicos, ou veículo (solução salina 0,9%, i.p). Após 15 minutos, receberam o composto SeBZF**1** (50 mg/kg, i.g) (GALL et al., 2020) ou veículo (óleo de canola). Transcorridos 30 minutos, foram submetidos ao TSC, no qual avaliou-se o tempo de latência para o primeiro episódio de imobilidade e o tempo total de imobilidade durante 6 min (STERU et al., 1985). Imediatamente antes do TSC, foi realizado o teste de campo aberto (TCA) para avaliação da atividade locomotora e exploratória (WALSH e CUMMINS, 1976).

2.4 Avaliação da toxicidade aguda do SeBZF1

Camundongos machos foram tratados com SeBZF**1** (300 mg/kg, intragástrica, i.g) ou veículo (óleo de canola). Durante 14 dias, o peso corporal e o consumo alimentar foram monitorados. Ao final, os camundongos foram avaliados no TCA. Subsequentemente ao TCA, os animais foram anestesiados e o sangue coletado por punção cardíaca para dosagem da atividade da aspartato aminotransferese (AST) e da alanina aminotransferase (ALT) (marcadores de função hepática) bem como os níveis de ureia (marcador de função renal).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Investigação do possível envolvimento de receptores β-adrenérgicos no efeito do tipo antidepressivo do SeBZF1

Como esperado, o composto SeBZF**1** foi capaz de diminuir o tempo total de imobilidade (Fig. 1A) e aumentar o tempo de latência (Fig. 1B) se comparado ao grupo controle.

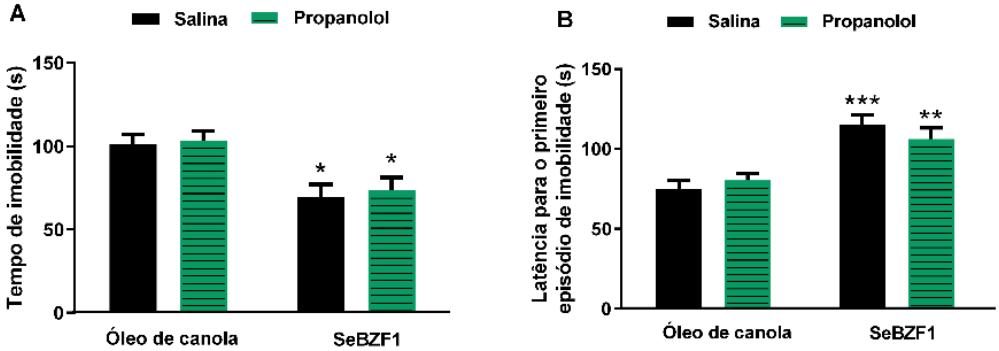


Figura 1. Efeitos da pré-administração de propranolol (2 mg/kg, i.p) sobre a ação do tipo antidepressiva do SeBZF**1** (50 mg/kg, i.g) em camundongos machos. (A) Tempo de imobilidade; (B)Tempo de latência no TSC. Os resultados estão apresentados como média ± E.P.M. (n=8-10/grupo). ANOVA de duas vias/Newman-Keuls. *p<0,05, ** p<0,001 e ***p<0,0001 em relação ao grupo controle.

A análise ANOVA de duas vias mostrou que não houve interação entre os tratamentos propanolol e SeBZF**1** no TSC para o tempo total de imobilidade [$F_{(1, 31)}$ = 0,02350, p<0,8792] e para a latência de imobilidade [$F_{(1, 31)}$ = 1,504, p<0,2293], evidenciando que o antagonista β-adrenérgico não causou bloqueio do efeito farmacológico do composto estudado (Fig. 1).

Além disso, os tratamentos *per se* ou combinados não influenciaram na atividade locomotora e exploratória dos animais avaliados pelo TCA (Fig. 2).

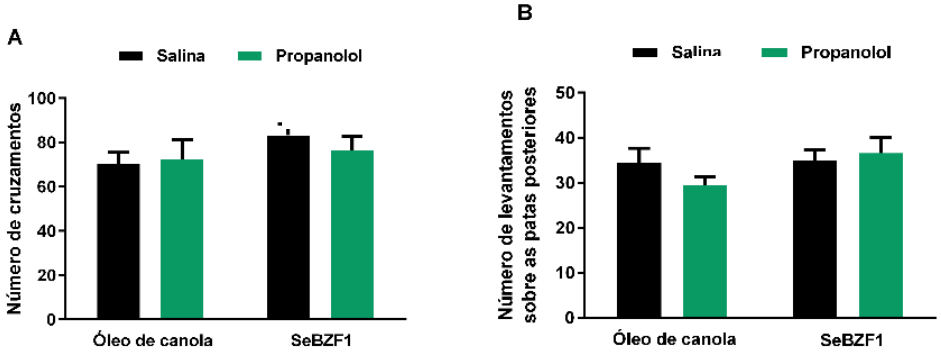
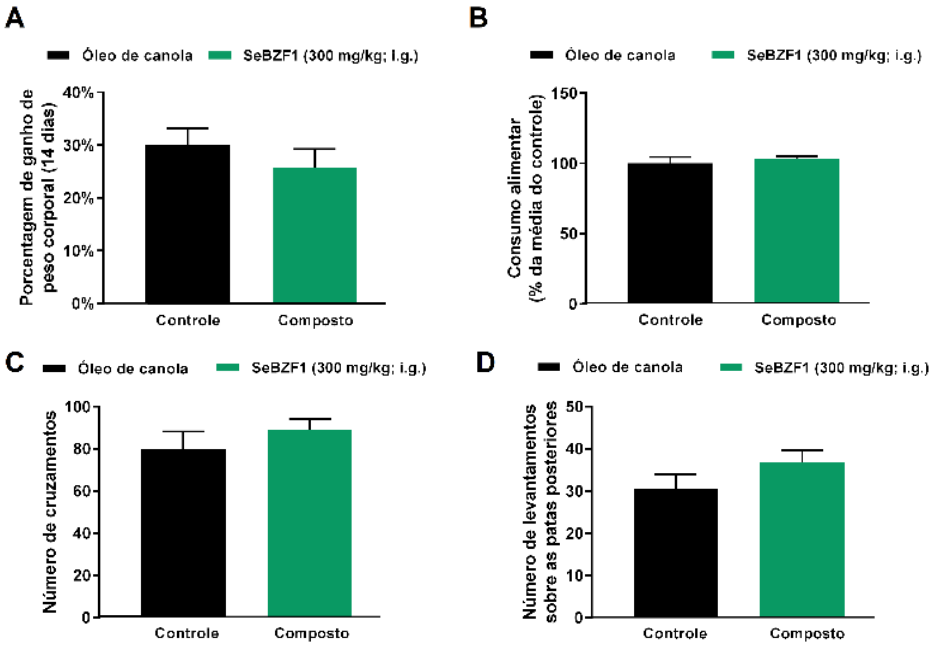


Figura 2. Efeito do tratamento com propanolol (2 mg/kg, i.p) e/ou SeBZF**1** (50 mg/kg, i.g) na atividade locomotora e exploratória dos animais no TCA.

3.2 Avaliação da toxicidade aguda do SeBZF1 em camundongos machos

A Figura 3 demonstra que o percentual de peso corporal (p=0,3920) (Fig. 3A), a ingestão alimentar (p=0,6158) (Fig. 3B) bem como a atividade locomotora (p=0,3659) (Fig. 3C) e exploratória (p=0,1825) (Fig. 3D) dos animais tratados com SeBZF**1** (300 mg/kg, i.g) não apresentaram alterações significativas quando comparados ao grupo controle.

Além disso, os resultados demostraram que a dosagem de AST (p= 0,5049), ALT (p= 0,4212) e ureia (p= 0,4768) em animais que receberam o SeBZF**1** foram semelhantes aos animais do grupo controle, sugerindo que não houve comprometimento hepático ou renal (Fig. 3 E, F e G).



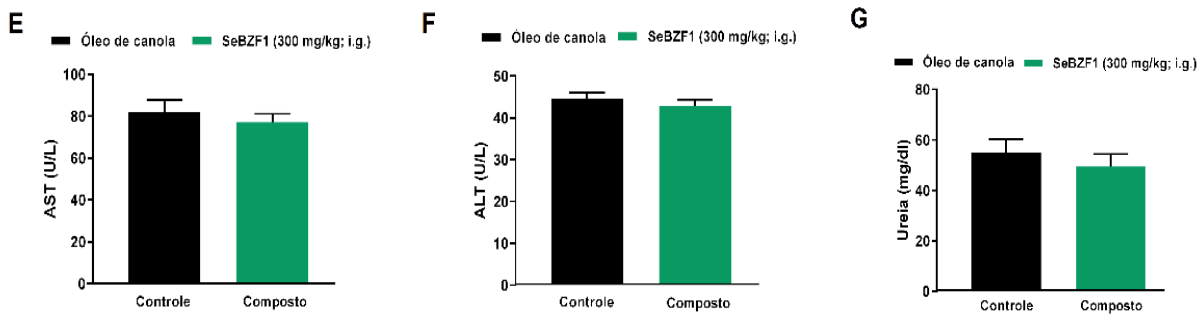


Figura 3. Parâmetros de toxicidade aguda em camundongos machos expostos à administração de SeBZF**1** (300 mg/kg, i.g). Os resultados são apresentados como média ± E.P.M. (n= 6/grupo). A ingestão de alimentos apresenta dados obtidos de 2 gaiolas/grupo contendo 3 animais por gaiola.

4. CONCLUSÕES

Infere-se, a partir dos resultados obtidos, que os receptores β-adrenérgicos não estejam envolvidos no efeito do tipo-antidepressivo do SeBZF**1** em camundongos já que a pré-administração de propranolol foi ineficaz em bloquear a ação farmacológica deste composto no TSC. Além disso, a partir dos dados apresentados é possível sugerir que o SeBZF**1** não causa toxicidade sistêmica aguda em camundongos Swiss machos adultos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, T. M *et al.* 'Involvement of the dopaminergic system in the antidepressant-like effect of the lectin isolated from the red marine alga Solieria filiformis in mice', **Int J Biol Macromol**, 111: 534-41.

CASARIL, A. M *et al*. Depression- and anxiogenic-like behaviors induced by lipopolysaccharide in mice are reversed by a selenium-containing indolyl compound: Behavioral, neurochemical and computational insights involving the serotonergic system. **Journal of Psychiatric Research**, v. 115, p. 1-12, 2019.

GALL, J. I *et al.* Insights into serotonergic and antioxidant mechanisms involved in antidepressant-like action of 2-phenyl-3 (phenylselanyl)benzofuran in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 102, p. 109956, 2020.

MALHI, G. S.; MANN, J.J. Depression. **The Lancet**, v.392, p.2299-2312, 2018.

SEKI, K.; YOSHIDA, S.; JAISWAL, M. K. Molecular mechanism of noradrenaline during the stress-induced major depressive disorder. **Neural Regeneration Research**, v.15, p.1159-1169, 2018.

STERU, L., CHERMAT, R., THIERRY, B., & SIMON, P. The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, Strasbourg, v. 85, n.3, p.367–370, 1985.

VENTURA, M; MELO, M; CARRILHO, F. Selenium and Thyroid Disease: From Pathophysiology to Treatment. **International Journal of Endocrinology**, v. 2017, p. 1-9, 2017.

VINCENT, M.; FILIPPINI, T.; WISE, L. A. Environmental Selenium and Human Health: an Update. **Current Environmental Health Reports**, v.5, p. 464-458, 2018.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The Open-Field test: a critical review. **Psychological Bulletin**, Brisbane, v. 83, n. 3, p. 482-504, 1976.

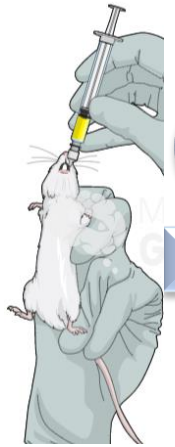
VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E DO POSSÍVEL ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES β-ADRENÉRGICOS NO EFEITO DO TIPO ANTIDEPRESSIVO DO COMPOSTO 2-FENIL-3-(FENILSELANIL)BENZOFURANO EM CAMUNDONGOS SWISS MACHOS.

LETÍCIA DEVANTIER KRÜGER[1]; DIANER NORNBERG STRELOW[2]; LUIZ ROBERTO CARRARO JÚNIOR[2];
TAÍS DA SILVA TEIXEIRA RECH[2]; CÉSAR AUGUSTO BRÜNING[2]; CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO[3]

Toxicidade aguda do SeBZF**1** (300 mg/kg, i.g)

Administração do composto



30' 60' 90' Após 14 dias

100 mg/kg | 100 mg/kg | 100 mg/kg | TCA



Punção cardíaca



Centrifugação: obtenção do plasma

- AST
- ALT
- Ureia

Testes bioquímicos

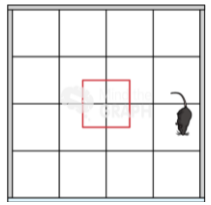
Avaliação do possível envolvimento dos receptores β-adrenérgicos no efeito do tipo antidepressivo do SeBZF**1**



15min



30min



TCA: 4min



TSC: 6min

Propanolol ou veiculo	**SeBZF1 ou veiculo**
2 mg/kg, i.p	50 mg/kg, i.g

O antagonista não seletivo dos receptores β-adrenérgico (propanolol) foi ineficaz no bloqueio do efeito anti-imobilidade do composto.

7-CLORO-4-(FENILSELANIL)QUINOLINA REVERTE O COMPORTAMENTO DEPRESSIVO INDUZIDO PELO ESTRESSE AGUDO DE CONTENÇÃO EM CAMUNDONGOS

LUIZA BLOTA CORRÊA[1]; RENATA LEIVAS DE OLIVEIRA[2]; ALLYA LARROZA[3];DIEGO ALVES[4];ETHEL ANTUNES WILHELM[5]; CRISTIANE LUCHESE[6]

[1]Universidade Federal de Pelotas – blottaluiza@gmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas – renataleivas15@hotmail.com
[3]Universidade Federal de Pelotas – allya.larroza@yahoo.com.br
[4]Universidade Federal de Pelotas – diego.alves@ufpel.edu.br
[5]Universidade Federal de Pelotas – ethelwilhelm@yahoo.com.br (coorientadora)
[6]Universidade Federal de Pelotas – cristiane_luchese@yahoo.com.br (orientadora)

1. INTRODUÇÃO

A depressão é um transtorno psiquiátrico multifatorial e incapacitante, caracterizada por sentimentos de tristeza e perda de interesse em atividades rotineiras (ANISMAN et al. 2018). A exposição ao estresse ocasiona um desequilíbrio na homeostase corporal, resultando em alterações fisiológicas, modificações comportamentais, emocionais e cognitivas que podem aumentar o risco de progressão de distúrbios neuropsiquiátricos (ROSENBLAT et al. 2015).

O modelo animal de estresse agudo de contenção (EAC) é amplamente utilizado por causar um comportamento relacionado à depressão em roedores, sendo capaz de induzir alterações comportamentais e neuroquímicas similares aquelas encontradas em pacientes com este transtorno (KLENEROVÁ et al. 2007). Este transtorno quando induzido por estresse ocasiona a ativação de diversas vias intracelulares envolvidas no aumento da produção de radicais livres (MOYLAN et al. 2014). De fato, o estabelecimento do estresse oxidativo cerebral tem sido associado a alterações neuropatogenéticas induzidas por diferentes tipos de estresse em roedores (JEVTIĆ et al. 2016).

Atualmente existem diversos tratamentos disponíveis para os transtornos depressivos. No entanto, não são totalmente eficazes e possuem efeitos colaterais, como náusea, perda de desejo sexual e insônia (MORSINK et al. 2006). Portanto, torna-se importante a busca por novos tratamentos com menores efeito colaterais e uma maior eficácia.

Diante disto, o 7-cloro-4-(fenilselanil) quinolina (4-PSQ), um derivado de quinolina contendo um grupo organoselênio, tem sido estudado por nosso grupo de pesquisa. Anteriormente, foi demonstrado que o 4-PSQ teve efeito em distúrbios que afetam o sistema nervoso central, tais como a ansiedade (REIS et al. 2017) e o estresse oxidativo cerebral (VOGT et al. 2018). Tendo em vista os aspectos mencionados, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito tipo-antidepressivo do 4-PSQ em um modelo de depressão induzida por EAC. Além disso, foi investigado se o EAC promove um aumento da peroxidação lipídica cerebral, bem como o efeito do composto neste parâmetro.

2. METODOLOGIA

Para realização do experimento foram utilizados camundongos machos da raça *Swiss* (25-35g). Os experimentos foram aprovados pela Comissão de

Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) (CEEA 43302-2019), Brasil. O composto 4-PSQ (Figura 1) foi sintetizado no Laboratório de Síntese Orgânica Limpa da UFPel de acordo com DUARTE e colaboradores (2017).

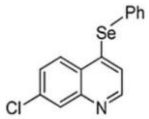


Figura 1. Estrutura química do 7-cloro-4-(fenilselanil)quinolina (4-PSQ)

Para a realização do protocolo experimental, inicialmente os animais foram divididos em 5 grupos experimentais (7 animais por grupo): **(I)** controle (não estressado), **(II)** 4-PSQ (não estressado), **(III)** controle **-** EAC, **(IV)** EAC + 4-PSQ e **(V)** EAC + Paroxetina O protocolo de EAC foi realizado conforme descrito anteriormente por ZAFIR e colaboradores (2009). Esse método consiste em promover o estresse nos animais colocando-os em uma condição de restrição, através da introdução dos camundongos em um tubo fenestrado, por um período de 4 horas. Em seguida os animais foram removidos e mantidos sob condições ambientais padrão (22±1°C) com livre acesso a água e ração por 10 minutos para readaptação dos movimentos. Os animais não estressados permaneceram com acesso a água e ração durante as 4 horas. Após, os animais dos grupos **I** e **III** receberam óleo de canola (veículo dos compostos, 10 ml/Kg) por via intragástrica (i.g.), os grupos **II** e **IV** receberam o 4-PSQ (10 mg/Kg, i.g.) e o grupo **V** recebeu a paroxetina (controle positivo, 10 mg/Kg, i.g.). Após transcorridos 30 minutos, os animais foram submetidos ao teste do nado forçado (TNF).

O TNF é um parâmetro comportamental utilizado para avaliar o efeito tipo-antidepressivo de drogas (PORSOLT et al. 1977). Neste teste, os camundongos foram forçados a nadar individualmente em um recipiente cilíndrico aberto, contendo 19 cm de água a 25±1°C. A duração da imobilidade foi registrada durante um período de 6 minutos. Uma diminuição na duração da imobilidade é um indicativo do efeito tipo-antidepressivo do composto avaliado. Após o teste comportamental, os animais foram submetidos a eutanásia e os córtices cerebrais e hipocampos foram removidos para avaliação dos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Esse ensaio avalia a peroxidação lipídica baseando-se na detecção e quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), de acordo com OHKAWA e colaboradores (1979).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme demonstrado na figura 2A, os animais submetidos ao EAC apresentaram um aumento no tempo de imobilidade no TNF, quando comparado aos animais não estressados. Ainda, o tratamento com o 4-PSQ ou com a paroxetina reverteu o efeito tipo-depressivo causado pelo estresse, demonstrando assim um efeito tipo-antidepressivo destes.

Em relação ao parâmetro de dano oxidativo avaliado, podemos observar na figura 2B e 2C que o estresse proporcionou um aumento na peroxidação lipídica no córtex pré-frontal e no hipocampo de camundongos quando comparado ao grupo não estressado, respectivamente. Os resultados sugerem que o tratamento com o 4-PSQ foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica no

córtex pré-frontal (Figura 2B) e no hipocampo (Figura 2C) ocasionada pelo estresse nos animais. Por outro lado, a paroxetina foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica apenas no córtex pré-frontal dos camundongos expostos ao estresse (Figura 2B).

No geral, as espécies reativas produzidas durante o estresse promovem um aumento na peroxidação lipídica, como evidenciado pelo aumento da formação de malondialdeído (MDA) (MAES et al. 2011), que de fato é a principal consequência do estresse oxidativo no cérebro. Desta maneira, neste estudo, uma única dose de 4-PSQ foi capaz de reverter a resposta comportamental ao estresse de contenção no TNF. Acredita-se que este efeito, seja pelo menos em parte através da modulação do estresse oxidativo, via redução da peroxidação lipídica em estruturas cerebrais de camundongos.

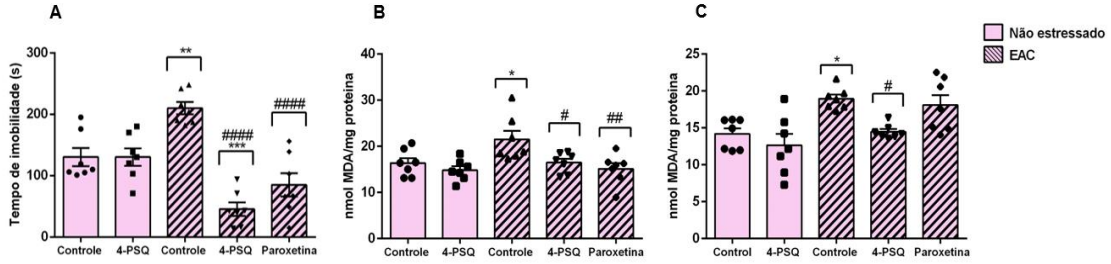


Figura 2. Efeitos do composto 4-PSQ no (A) teste do nado forçado e nos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico no (B) córtex pré-frontal e (C) no hipocampo de camundongos após o estresse agudo de contenção (EAC). Os dados são reportados como média ± erro padrão da média (SEM). (*), (**) e (***) denotam p <0,05; p <0,01 e p <0,001 respectivamente, em comparação com o grupo controle não estressado. (#), (##) e (####) indicam p <0,05; p <0,01 e p <0,0001 respectivamente, em comparação com o grupo submetido ao EAC. (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey).

4. CONCLUSÕES

Em conclusão, este estudo demonstrou que o composto 4-PSQ exerceu um efeito tipo-antidepressivo no TNF em camundongos submetidos ao estresse de contenção. Além disto, os resultados sugerem que a modulação do estresse oxidativo possa estar envolvida no efeito tipo-antidepressivo do composto neste modelo. Porém são necessários mais estudos para melhor elucidar o potencial do 4-PSQ para o tratamento da depressão associada ao estresse.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANISMAN, H.; MERALI, Z.; HAYLEY, S. Neurotransmitter, peptide and cytokine processes in relation to depressive disorder: comorbidity between depression and neurodegenerative disorders. **Progress in Neurobiology**, Canada, v.85, n.1, p.1–74, 2018.

DUARTE, L.F.B.; BARBOSA, E.S.; OLIVEIRA, R.L.; PINZ, M.P.; GODOI, B.; SCHUMACHER, R.F.; LUCHESE, C.; WILHELM, E.A.; ALVES, D. A simple method for the synthesis of 4-arylselanyl-7-chloroquinolines used as in vitro acetylcholinesterase inhibitors and in vivo memory improvement. **Tetrahedron Letters**, Brasil, v.58, n.33 p.3319-3322, 2017.

JEVTIĆ, G.; NIKOLIĆ, T.; MIRCIĆ, A.; STOJKOVIĆ, T.; VELIMIROVIĆ, M.; TRAJKOVIĆ, V.; MARKOVIĆ, I.; TRBOVICH, A.M.; RADONJIĆ, N.V.;

PETRONIJEVIĆ, N. Mitochondrial impairment, apoptosis and autophagy in a rat brain as immediate and long-term effects of perinatal phencyclidine treatment—influence of restraint stress. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, Serbia, v.66, n.3, p.87–96, 2016.

KLENEROVÁ, V.; SÍDA, P.; KREJCÍ, I.; HLINÁK, Z.; HYNIE, S. Effects of two types of restraint stress on spontaneous behavior of Sprague-Dawley and Lewis rats. **Journal of Physiology and Pharmacology,** República Tcheca, v.58, n.1, p.83-94, 2007.

MAES, M.; GALECKI, P.; CHANG, Y.S.; BERK, M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, Tailândia, v.35, n.3, p.676– 692, 2011.

MOYLAN, S.; BERK, M.; DEAN, O.M.; SAMUNI, Y.; WILLIAMS, L.J.; O'NEIL, A.; HAYLEY, A.C.; PASCO, J.A.; ANDERSON, G.; JACKA, F.N.; MAES, M. Oxidative & nitrosative stress in depression: why so much stress? **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, Austrália, v.45, n.2014, p.46–62, 2014.

MORSINK, M.C.; STEENBERGEN, P.J.; VOS, J.B.; KARST, H.; JOELS, M.; KLOET, E.R.; DATSON, N.A. Acute activation of hippocampal glucocorticoid receptors results in different waves of gene expression throughout time. **Journal of Neuroendocrinology**, Netherlands, v.18, n.4, p.239–252, 2006.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K.; Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, Japão, v.95, n.2, p.351-358, 1979.

PORSOLT, R.D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, Europa v.266, n.5604, p.730–732, 1977.

REIS, A.S.; PINZ, M.; DUARTE, L.F.; ROEHRS, J.A.; ALVES, D.; LUCHESE, C.; WILHELM, E.A. 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline, a novel multitarget compound with anxiolytic activity: Contribution of the glutamatergic system. **Journal of Psychiatric Research**, Brasil, v.84, n.2017, p.191-199, 2017.

ROSENBLAT, J.D.; MCINTYRE, R.S.; ALVES, G.S.; FOUNTOULAKIS, K.N.; CARVALHO, A.F. Beyond monoamines-novel targets for treatment-resistant depression: a comprehensive review. **Current Neuropharmacology**, Brasil, v.13, n.5, p.636–655, 2015.

VOGT, A.G.; VOSS, G.T.; OLIVEIRA, R.L., PALTIAN, J.J.; DUARTE, L.F.B.; ALVES. D.; JESSE, C.R.; ROMAN, S.S.; ROEHRS, J.A.; WILHELM, E.A.; LUCHESE, C. Organoselenium group is critical for antioxidant activity of 7-chloro-4-phenylselenyl-quinoline. **Chemico-Biological Interactions**, Brasil, v.25, n.282, p.7-12, 2018

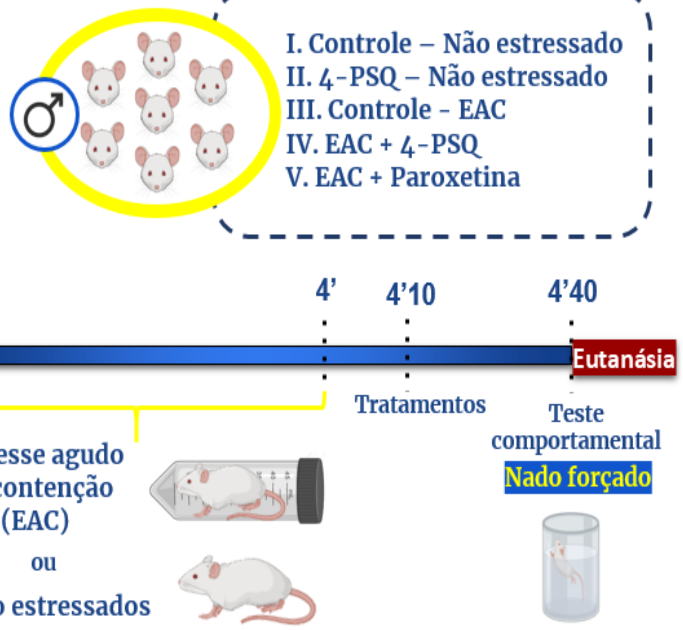
ZAFIR, A.; ARA, A., BANU, N. In vivo antioxidant status: a putative target of antidepressant action. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, India, v.33, n.2, p.220–228, 2009.

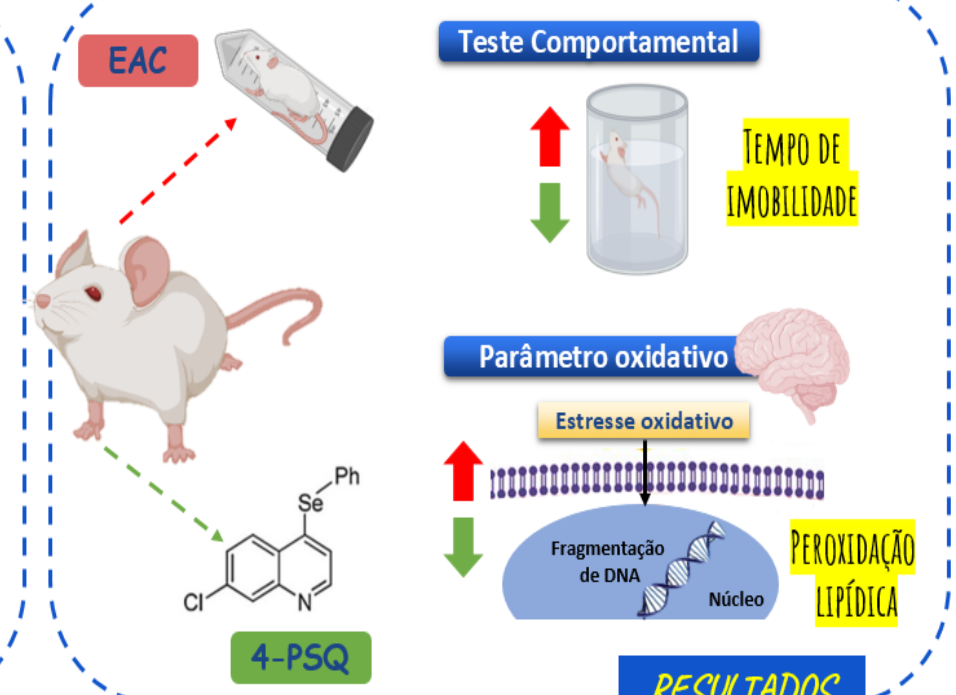
VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

7-CLORO-4-(FENILSELANIL)QUINOLINA REVERTE O COMPORTAMENTO DEPRESSIVO INDUZIDO PELO ESTRESSE AGUDO DE CONTENÇÃO EM CAMUNDONGOS

LUIZA BLOTA CORRÊA[1]; RENATA LEIVAS DE OLIVEIRA[2]; ALLYA LARROZA[3]; DIEGO ALVES[4];ETHEL ANTUNES WILHELM[5]; CRISTIANE LUCHESE[6]

PROTOCOLO EXPERIMENTAL





RESULTADOS

SÍNDROME DE COWDEN: UMA ANÁLISE DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA EM BANCOS DE DADOS NACIONAIS E INTERNACIONAIS

MARIA CAROLINA ALVES DA SILVA[1]; AIANE HIRRAELA FERREIRA DOS SANTOS MARTINZ[2]; ANA CAROLINE DE LIMA SILVA[2]; BRUNARA EVELY DE ARAUJO LIMA[2]; DANIELA DA SILVA SOUZA[2]; MICHELY CORREIA DINIZ[3]

[1]Universidade Federal do Vale do São Franciaco – mariacchase@gmail.com
2Universidade Federal do Vale do São Franciaco- aianehirraela@gmail.com
[2]Universidade Federal do Vale do São Franciaco– caarollima@hotmail.com
2Universidade Federal do Vale do São Franciaco- brunara.evely@hotmail.com
2Universidade Federal do Vale do São Franciaco- danielajac02@gmail.com
[3]Universidade Federal do Vale do São Franciaco – mychely.diniz@univasf.edu.br

1. INTRODUÇÃO

O Ministério da Saúde (2019) estima a ocorrência de 625 mil casos de câncer no Brasil, por ano, nos anos 2020-2022. O câncer é causado por mutações no DNA, que na maior parte das vezes, são induzidas por agentes externos ou adquiridas espontaneamente, apenas 3 a 5% dessas mutações podem ser herdadas, caracterizando o câncer hereditário (OLIVEIRA, 2018).

Dentre as síndromes que predispõe ao câncer está a Síndrome de Cowden, uma doença autossômica dominante, cuja maior parte dos casos é proveniente de uma mutação no gene *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*), que está associado à regulação negativa da proliferação e sobrevivência celular, localizado no cromossomo (10q22-23) (RODRIGUES, 2011; LIMA, 2012; INFANTE AMOROS, 2018; KAWASE, 2020).

O estudo objetivou analisar a produção científica sobre a síndrome de Cowden, priorizando os anos de 2018 a 2020, abrangendo publicações nacionais e internacionais.

2. METODOLOGIA

Foram realizadas buscas por artigos científicos, no mês de agosto de 2020, nas bases de dados *Scientific Electronic Library Online*- Scielo (www.scielo.com) e PubMed (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/), sem restrição de período. Para efetuar a busca utilizaram-se as seguintes palavras-chave: *Cowden syndrome* e *multiple hamartoma syndrome*. Durante as pesquisas no PubMed, os termos selecionados foram utilizados na pesquisa avançada preenchendo o campo Título/Resumo. No Scielo as palavras chaves foram pesquisadas utilizando o campo de busca com todos os índices selecionados. Os resultados foram organizados em uma planilha contendo título, autoria, ano de publicação, banco de dados e as palavras-chave utilizadas na busca. Posteriormente, foi realizada a leitura dos resumos e títulos dos artigos, dos últimos três anos para obter informações sobre as pesquisas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na base de dados Scielo foram encontrados 36 artigos, e no PubMed 760, conforme a tabela 1. É possível observar que os artigos se concentram na plataforma do Pubmed. Fato possivelmente explicado por se tratar de um recurso de pesquisa em medicina e biomedicina bastante confiável, com seus dados atualizados rapidamente, tanto na versão inicial online como na literatura impressa (FALAGAS, 2008).

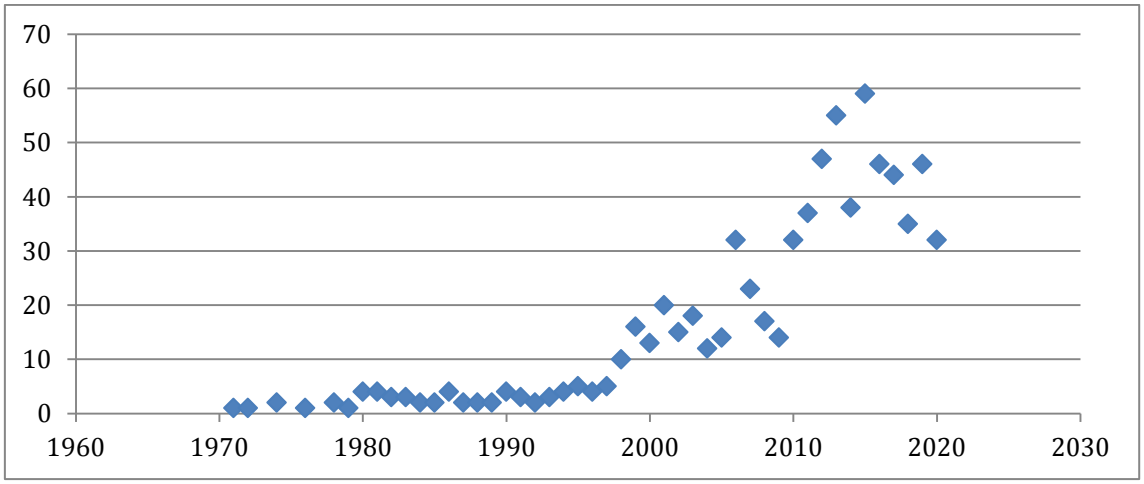
Tabela 1- Distribuição de artigos por bancos de dados e palavras-chave sem a remoção das duplicidades.

Palavra-chave	Banco de dados	Número de artigos
Cowden syndrome	PubMed	635
Multiple hamartoma syndrome	PubMed	125
Cowden syndrome	Scielo	19
Multiple hamartoma syndrome	Scielo	17
		796

Fonte: Autoria própia (2020).

As duplicidades, obtidas da comparação entre os títulos e nomes dos autores, foram removidas e por fim registrou-se 746 artigos. Após a remoção e análise das datas de publicações, foi possível obter a produção científica por ano, observada no gráfico 1.

Gráfico 1- Número de publicações por ano.



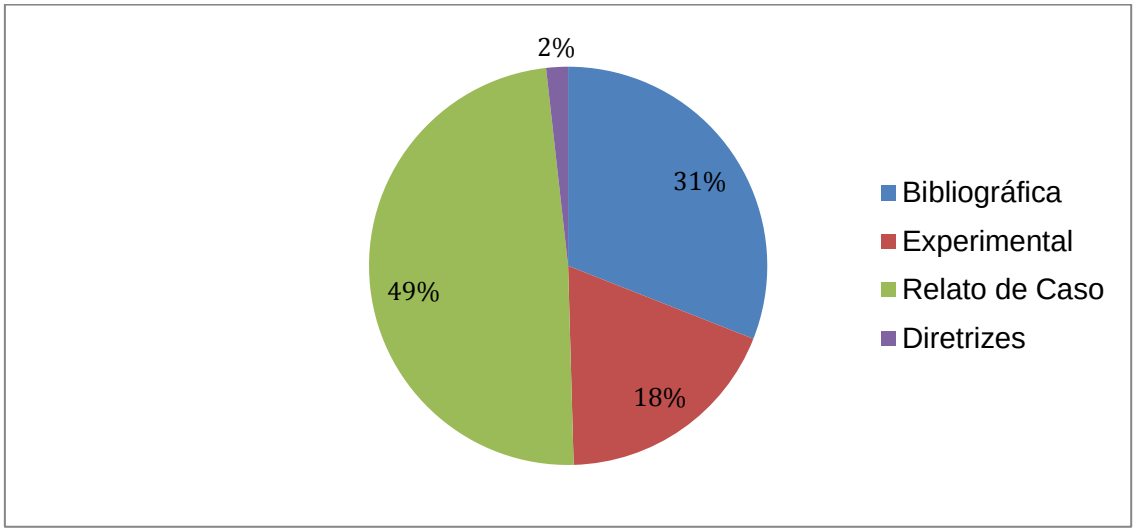
Fonte: Autoria própia (2020).

O primeiro artigo foi registrado no ano de 1971, e até o ano de 1997, observou-se uma produção científica baixa, com cerca de 2,5 artigos por ano. A partir 1998 a quantidade de publicações se torna mais significativa, tendo seu pico no ano de 2015, com quase 60 publicações. O ano de 2020 registra 32 artigos até a presente data.

Depois da leitura dos resumos, os artigos foram agrupados em quatro modalidades, adaptadas de SIGELMANN (1984) e NOBRE & BERNARDO (2002), apresentadas no gráfico 2.

Bibliográfica: revisões de estudos com intuito de acumular o conhecimento sobre o tema.
Experimental: pesquisas realizadas em laboratório, ou não, que testa uma hipótese a partir da escolha do objeto de estudo, seleção de variáveis independentes e o efeitos dessas variáveis sobre o mesmo.
Relato de Caso: pesquisas que descrevem detalhadamente um caso clínico.
Diretrizes: orientações feitas pelas Sociedades de Especialidade.

Gráfico 2- Classificação dos artigos com base no modelo de pesquisa.



Fonte: Autoria própia (2020).

Dos 114 artigos pulicados nos anos 2018 a 2020, 55 deles (49%) são relatos de caso, quase metade do total. Em seguida vêm as revisões bibliográficas com 35 artigos (31%), concentrando 80% das publicações nas duas modalidades.

4. CONCLUSÕES

Infere-se que a análise dos artigos relacionados à Síndrome de Cowden levantou um número considerável de publicações, que pode ser útil em planejamentos de pesquisas futuras. Também foi observada a carência das pesquisas relacionadas à origem da síndrome. Contudo, a elevada quantidade de relatos de caso é importante para a melhor identificação dos casos, considerando as várias formas de manifestação clínica da doença.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FALAGAS, M. E *et al*. Comparison of PubMed, Scopus, web of science, and Google scholar: strengths and weaknesses. **The FASEB journal**, v. 22, n. 2, p. 338-342, 2008.

INFANTE AMOROS, A. L. *et al*. Síndrome de Cowden. **Rev Cubana Endocrinol** , Cidade de Havana, v. 29, n. 2 P. 1-5, 2018.

KAWASE, Y.*at al*. A case of Cowden syndrome with a novel mutation in the PTEN gene. **J Med Invest**. p. 200-201, 2020.

LIMA, E.U. de *et al* . New mutation in the PTEN gene in a Brazilian patient with Cowden's syndrome**. Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo , v. 56, n. 8, p. 592-596, Nov. 2012 .

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, RJ: INCA; 2019. Disponível em: https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf. Acesso em 14 ago. 2020.

NOBRE, M. R. C; BERNARDO, W.M. Diretrizes AMB / CFM. **Rev. Assoc. Med. Bras**.São Paulo, v. 48, n. 4, p. 290, dezembro de 2002. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302002000400027&lng=en&nrm=iso. Acesso em 11 de agosto de 2020

OLIVEIRA, P. C. de. **Suscetibilidade genética ao câncer hereditário e espotádico na população de Monte Santo-BA**. 2018. 82 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2018.

RODRIGUES, M.J. **Síndrome de Cowden – Caso Clínico**. 2011. 21f Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina)- Instituto Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto.

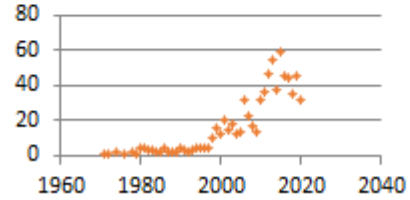
SIGELMANN, E. Tipos de pesquisa: aspectos metodológicos específicos. **Arquivos Brasileiros de Psicologia**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 3, p. 141-155, abr. 1984. Disponível em: http://bibliotecadigital.fgv.br/ojs/index.php/abp/article/view/19012/17746. Acesso em: 11 Ago. 2020.

SÍNDROME DE COWDEN: UMA ANÁLISE DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA EM BANCOS DE DADOS NACIONAIS E INTERNACIONAIS

MARIA CAROLINA ALVES DA SILVA[1]; AIANE HIRRAELA FERREIRA DOS SANTOS MARTINZ[2]; ANA CAROLINE DE LIMA SILVA[2]; BRUNARA EVELY DE ARAUJO LIMA[2]; DANIELA DA SILVA SOUZA[2]; MICHELY CORREIA DINIZ[2]

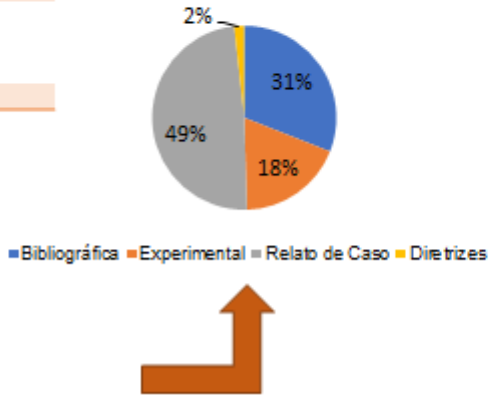
Palavra-chave	Banco de dados	Número de artigos
Cowden syndrome	PubMed	635
Multiple hamartoma syndrome	PubMed	125
Cowden syndrome	Scielo	19
Multiple hamartoma syndrome	Scielo	17
		796

Pesquisa nos bancos de dados



Publicações por ano

Classificações com base no modelo de pesquisa



Conclusões

- Carência das pesquisas relacionadas à origem da síndrome;
- Elevada quantidade de relatos de caso é importante para a melhor identificação dos casos.

INFLUÊNCIA DO pH E TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE PROTEÁSICA DE UMA SERINO PROTEASE LIVRE E IMOBILIZADA EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

MILENA TEREZA TORRES DO COUTO[1]; BRUNO VINÍCIUS BARROS REGUEIRA[2]; MARLLYN MARQUES DA SILVA[3]; ANA CRISTINA LIMA LEITE[4]; ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO[5]; THIAGO PAJEÚ NASCIMENTO[6]

[1]*Universidade Federal de Pernambuco – torresc.milena@gmail.com*
[2]*Universidade Federal de Pernambuco – brunovbregueira@gmail.com*
[3]*Universidade Federal Rural de Pernambuco – marllynmsilva@yahoo.com.br*
[4]*Universidade Federal de Pernambuco – acllb2003@yahoo.com.br*
[5]*Universidade Federal Rural de Pernambuco – analuporto@yahoo.com.br*
[6]*Universidade Federal Rural de Pernambuco – thiago_pajeu@hotmail.com*

1. INTRODUÇÃO

Dentre as enzimas que possuem aplicação industrial as proteases são as que correspondem o maior percentual de utilização, sendo em torno de 60% do total de enzimas comercializadas no mundo. As oriundas de fontes microbianas são as mais atraentes devido ao uso de métodos mais simples de produção, extração, controle e facilidade à manipulação genética. Entretanto, o principal obstáculo à utilização dessas enzimas é o seu custo de pureza, estabilidade e especificidade, que afetam diretamente o rendimento. Desse modo, a utilização de metodologias ou técnicas que promovam uma recuperação ou purificação de proteases é essencial.

A imobilização de enzimas é uma técnica simples e que garante uma maior estabilidade e possibilidade de reciclagem, o que diminui o custo do processo (HOMAEI, 2017). As nanopartículas magnéticas (NPMs) têm sido atraente para imobilização de proteases devido às suas características vantajosas, como tamanho reduzido, alta capacidade magnética para aplicação de um campo magnético externo e por possuírem baixa ou nenhuma toxicidade. Após a imobilização é ideal que se estude alguns fatores de natureza físico-química, principalmente o pH e a temperatura, pois, caso não haja um controle das suas condições operacionais ótimas, pode ocasionar uma ineficiência do processo de imobilização levando a grandes prejuízos econômicos.

O objetivo deste trabalho foi de estudar a influência dos parâmetros físico-químicos pH e temperatura sobre a atividade proteásica de uma serino protease livre e imobilizada em nanopartículas de magnetita revestidas com polianilina e avaliar a sua compatibilidade sanguínea.

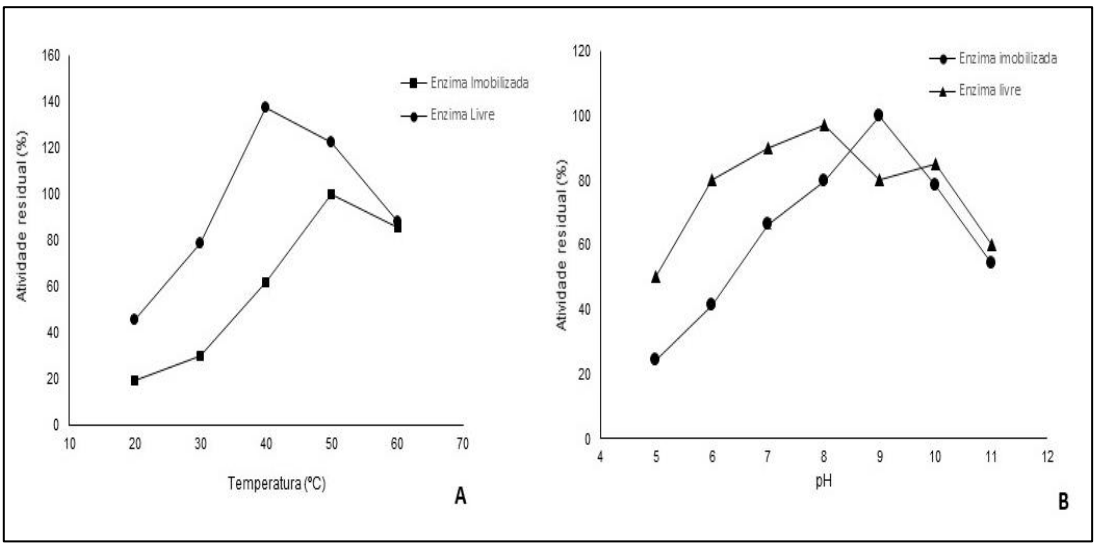
2. METODOLOGIA

A serino protease foi obtida pelo *Mucor subtilissimus* UCP1262 e a purificação da enzima foi feita através de sistema de duas fases aquosas, no qual a enzima foi particionada para a fase sal (NASCIMENTO et al., 2016). As NPMs foram obtidas por magnetita e revestidas por polialinina (DUARTE NETO et al., 2018). Após o revestimento foi adicionada à serino protease (10 mg/mL). Na determinação da atividade proteásica, foi utilizado como substrato a azocaseína (1%) (GINTHER, 1979). O efeito da temperatura foi avaliado através da incubação da serino protease livre e imobilizada a temperaturas variando de 20 a 60ºC. Quanto ao pH, foram utilizadas faixas de 5,0 a 11,0. Para o ensaio de compatibilidade sanguínea, foi utilizado sangue humano, sendo a coleta aprovada pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CEP/CONEP-CAAE: 86387117.6.0000.5208).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As NPMs tiveram grande eficiência na imobilização da serino protease, o tempo de ativação de 4 horas utilizado neste trabalho foi suficiente para proporcionar a imobilização de 61,35% da enzima. O efeito da temperatura na atividade enzimática da protease livre e imobilizada foi investigado na faixa de 20 a 60ºC. A Figura 1A apresenta o efeito da temperatura na atividade da serino protease livre e imobilizada. A enzima imobilizada apresentou melhor atividade na temperatura de 50ºC, o que difere da enzima livre, que foi de 40ºC. A Figura 1B mostra o efeito do pH, sendo a maior atividade enzimática em pH 9, o que difere da protease livre, a qual apresentou maior atividade em pH 8.

Figura 1 - Influência da temperatura (A) e do pH (B) na atividade proteásica da serino protease livre e imobilizada em NPMs.



De acordo com os padrões da ASTM (Sociedade Americana para Testes e Designação de Materiais) substâncias com hemólise > 5% são consideradas hemolíticas, 2-5% ligeiramente hemolíticas, enquanto < 2% não-hemolíticas. A serino protease livre obteve um percentual de 2,63%±0,06%, sendo considerada ligeiramente hemolítica, enquanto que imobilizada não causou hemólise, tendo um percentual de 2,12%±0,08%, sendo esses resultados satisfatórios e promissores.

A imobilização em NPMs alterou a temperatura e o pH ótimo da atividade proteásica da enzima imobilizada quando comparada a livre, indo de acordo ao de uma protease produzida por *Penicillium* que teve sua atividade máxima alterada em relação ao pH ótimo quando ela foi imobilizada em NPMs (DUARTE NETO et al., 2018). Dados da figura 1 diferem do que foi encontrado para um processo de imobilização da enzima peroxidase em NPMs, onde a temperatura e o pH ótimo para a enzima livre e imobilizada foram os mesmos: 20ºC e 6, respectivamente (DARWESH et al., 2019). Um nanomaterial hemolítico quando em contato com o sangue pode causar perda ou danos às hemácias e pode produzir níveis aumentados de hemoglobina livre no plasma, capaz de induzir efeitos tóxicos ou estresse em diferentes órgãos. Logo, melhorar a hemocompatibilidade de enzimas e nanomateriais torna-se importante para seu uso industrial e clínico.

4. CONCLUSÕES

A serino protease principalmente imobilizada em NPMs é uma forte candidata para diversas aplicações industriais, sendo bem estabelecidos seus paramêtros físico-químicos de atividade ótima (pH 9,0 e temperatura 50ºC), o que possibilita uma alternativa promissora para aplicação dessa enzima na área biotecnológica e médica, uma vez que não mostrou quaisquer efeito tóxico sob os glóbulos vermelhos. Dessa forma, a serino protease imobilizada demonstra uma alternativa de liberação controlada e direcionada ao local de ação, aumentando o tempo de meia-vida e reduzindo custos e quantidade de doses.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DARWESH, O.M.; MATTER, I.A. EIDA, M.F. Development of Peroxidase Enzyme Immobilized Magnetic Nanoparticles for Bioremediation of Textile Wastewater Dye. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v, 7, n. 1, p. 102805, 2019.

DUARTE NETO, J.M.W.; WANDERLEY, M.C.A; LIMA, C.A.; PORTO, A.L.F. Single step purification via magnetic nanoparticles of new broad pH active protease from *Penicillium aurantiogriseum*. **Protein Expression and Purification**, v. 147, p. 22-28, 2018.

GINTHER, C.L. Sporulation and the production of serine protese and cephamycin C by *Streptomyces lactamdurans*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.15, p.522-526, 1979.

HOMAEI, A. Immobilization of *Penaeus merguiensis* alkaline phosphatase on gold nanorods for heavy metal detection. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 136, p. 1-7, 2017.

NASCIMENTO, T.P.; SALES, A.E.; PORTO, C.S.; BRANDÃO, R.M.; DE CAMPOS-TAKAKI, G.M.; TEIXEIRA, J.A.; PORTO, T.S.; PORTO, A.L.F.; CONVERTI, A. Purification of a fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 by aqueous two-phase systems (PEG/sulfate). **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in Biomedical and Life Sciences**, v. 1025, p. 16-24, 2016.

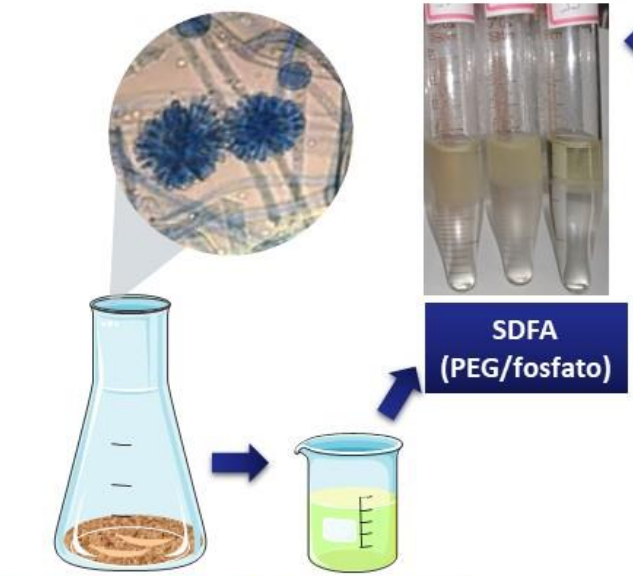
VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA

Saúde única

IV MOSTRA ACADÊMICA

INFLUÊNCIA DO pH E TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE PROTEÁSICA DE UMA SERINO PROTEASE LIVRE E IMOBILIZADA EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

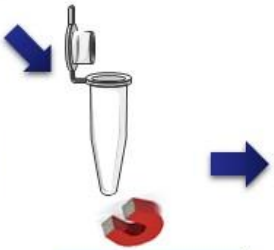
MILENA TEREZA TORRES DO COUTO[1]; BRUNO VINÍCIUS BARROS REGUEIRA[2]; MARLLYN MARQUES DA SILVA[3]; ANA CRISTINA LIMA LEITE[4]; ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO[5]; THIAGO PAJEÚ NASCIMENTO[6]



Fermentação em estado sólido

Extrato bruto

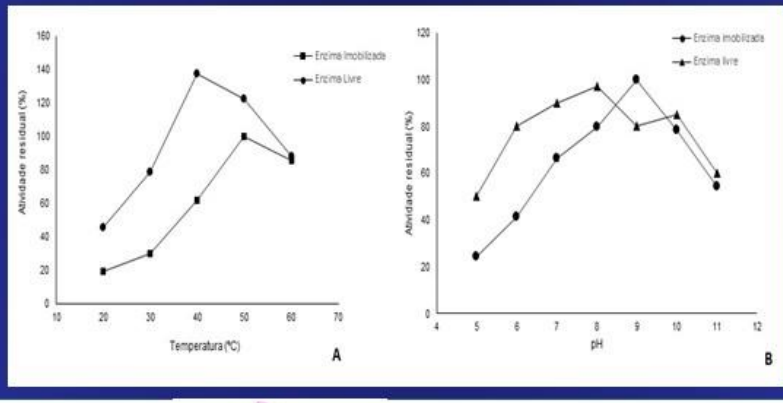
SDFA (PEG/fosfato)



Enzima Imobilizada

Enzima purificada

Influência da temperatura (A) e do pH (B) na atividade proteásica da serino protease livre e imobilizada em NPMs





Compatibilidade sanguínea

EFEITO DO EXTRATO DE *PSIDIUM CATTLEIANUM* NO PERFIL LIPÍDICO EM MODELO ANIMAL DE SÍNDROME METABÓLICA

RAPHAELA CASSOL PICCOLI[1]; JULIANE DE SOUZA CARDOSO[2]; REJANE GIACOMELLI TAVARES[3]; FRANCIELI MORO STEFANELLO[4];FERNANDA CARDOSO TEIXEIRA[5]; MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES[6]

[1]*Universidade Federal de Pelotas– raphaelacassol@gmail.com*
[2]*Universidade Federal de Pelotas– ju.souza591@gmail.com*
[3]*Universidade Federal de Pelotas– tavares.rejane@gmail.com*
[4]*Universidade Federal de Pelotas– fmstefanello@gmail.com*
[5]*Universidade Federal de Pelotas– fe.t@hotmail.com*
[6]*Universidade Federal de Pelotas– mspereirasoares@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

A síndrome metabólica (SM) pode ser definida como um conjunto de distúrbios metabólicos que conferem potencial risco para o desenvolvimento de enfermidades como doenças cardiovasculares (DCV) e diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) (BOMBELLI et al., 2018). A SM é caracterizada por fatores como intolerância à glicose, resistência à insulina, hiperinsulinemia, hipertensão arterial, dislipidemia e deposição central de gordura (OLIVEIRA et al., 2017). Sua patogênese é complexa, pois envolve tanto predisposição genética quanto estilo de vida não-saudável, caracterizado por sedentarismo e alimentação rica em calorias e pobre em fibras, que resultam em ganho de peso excessivo e acúmulo de gordura abdominal (ROCHLANI et al., 2017). A prevalência de SM já atinge aproximadamente um quarto da população mundial e apresenta comportamento crescente em todo o mundo (GUPTA et al., 2012).

Psidium cattleianum (*P. cattleianum*), popularmente conhecido como araçá, é um fruto natural do Rio Grande do Sul, pertencente à família Myrtaceae, que nos últimos anos vêm sendo objeto de diversos estudos que apontam sua atividade antioxidante (POSSA, 2016). Além disso, seu consumo pode reduzir o desenvolvimento de doenças degenerativas como DCV e DM2 (PEREIRA et al., 2018). Esses efeitos devem-se à sua composição rica em compostos bioativos, como antocianinas, carotenoides e vitamina C, dentre outros (POSSA, 2016).

Sendo assim, tendo em vista o conhecimento ainda limitado sobre o potencial efeito de *P. cattleianum* na SM e a necessidade de desenvolvimento de ferramentas terapêuticas alternativas para esta doença metabólica, este estudo objetivou determinar os efeitos da administração de extrato de *P. cattleianum* sobre parâmetros bioquímicos séricos de animais submetidos ao modelo experimental de SM.

2. METODOLOGIA

Para indução da SM foi ofertada dieta hiperlipídica (DHL) por 3 semanas seguida de injeção intraperitoneal de streptozotocina (STZ) (35mg/kg) em dose única. Foram utilizados 28 ratos *Wistar* adultos machos que foram divididos em 4 grupos (média de 7 animais por grupo): Grupo I- Controle, recebeu dieta padrão e água, Grupo II- recebeu DHL + STZ e água; Grupo III- recebeu DHL

+ STZ e Metformina (Met) (250mg/kg) e Grupo IV- recebeu DHL + STZ e extrato de *P. cattleianum* (200mg/kg). A água, o extrato e a Met foram administrados por via intragástrica uma vez ao dia durante todo período experimental.

Ao final do experimento os animais foram eutanasiados e o sangue foi coletado para separação do soro, o qual foi utilizado para mensuração dos níveis de colesterol total (CT), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL). Cabe salientar que todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEA n° 5747/2015).

A análise dos dados foi efetuada no programa estatístico GRAPHPAD PRISM 5.0 através de ANOVA de uma via, seguida do Teste *post hoc* de Tukey, e os valores foram considerados significativos quando $P< 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação aos níveis séricos de CT, o grupo que recebeu extrato de *P. cattleianum*, assim como o grupo que recebeu Met, apresentou níveis significativamente menores quando comparado ao grupo II, demonstrando assim um efeito protetor frente ao aumento do CT (Figura 1A). Em relação à lipoproteína VLDL, a administração de Met ou extrato de *P. cattleianum* foi capaz de prevenir significativamente o aumento apresentado no grupo II (Figura 1B). Acerca dos níveis de LDL, foi possível observar que apenas o grupo que recebeu extrato de *P. cattleianum* apresentou proteção frente ao aumento nos níveis dessa lipoproteína ocasionado por DHL+STZ (Figura 1C). Sobre os níveis de HDL, houve uma diminuição significativa no grupo II comparado ao grupo controle, no entanto, neste parâmetro, o uso de *P. cattleianum* ou Met não foi capaz de prevenir a alteração (Figura 1D)

Os resultados encontrados no presente estudo corroboram com os achados de OLIVEIRA et al. (2018 e 2020) em que a administração de extrato de *P. cattleianum* também foi eficiente em melhorar perfil lipídico como os níveis de TG, CT e LDL em modelo animal de SM. Embora os mecanismos por trás das ações dos polifenóis encontrados nesse fruto ainda não sejam inteiramente elucidados, estudos sugerem que as ações hipoglicêmicas destes compostos se devem à sua atividade de inibição de enzimas que digerem carboidratos como α-amilase, além de redução da captação de glicose no intestino, estimulação de secreção insulínica e proteção às células β-pancreáticas contra a glicotoxicidade (KIM, KEOGH & CLIFTON, 2016).

Ademais, estudos sugerem que os compostos fenólicos além de estimularem a excreção de ácidos biliares, ainda modulam a expressão de proteínas intestinais transportadoras de colesterol e, dessa maneira, prevenirem sua absorção (BATISTA et al., 2018). Desta maneira, foi observado em nosso estudo que estes compostos foram significativamente eficazes em modular positivamente o perfil lipídico do grupo tratado com *P. catteianum* através dos valores séricos de CT e de lipoproteínas, conferido assim ação protetora à eventos cardiovasculares.

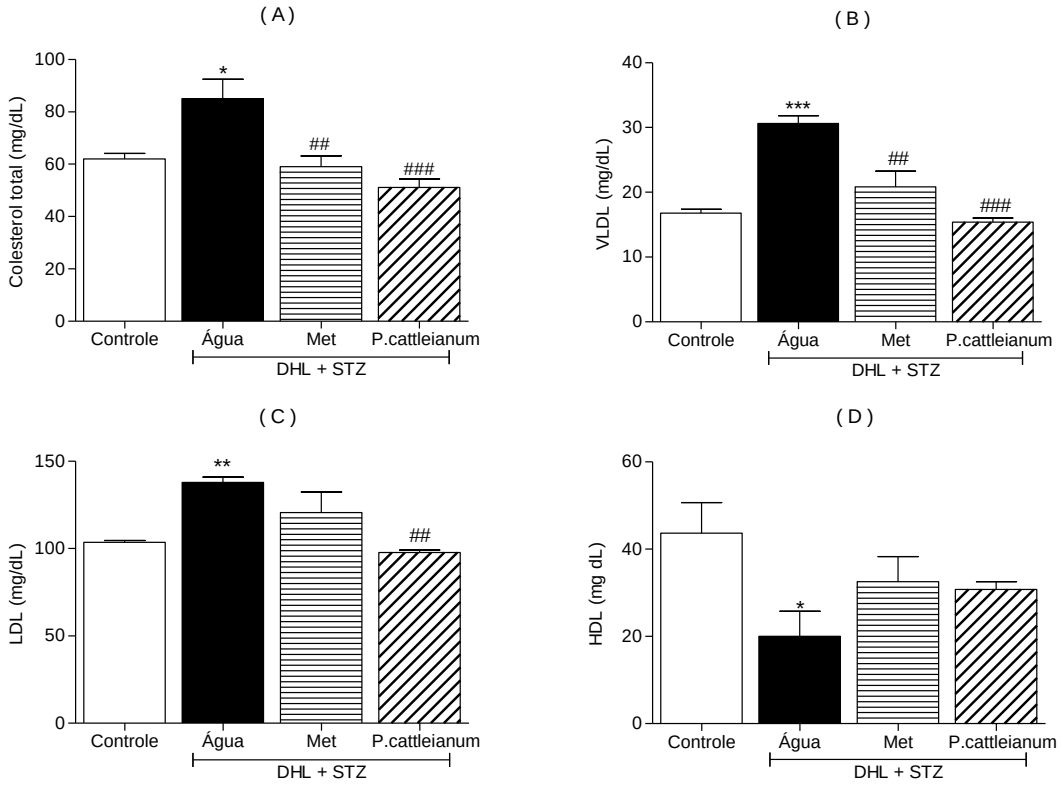


Figura 1: Efeito do extrato de *P. cattleianum* nos níveis de colesterol total (A) e das lipoproteínas VLDL (B), LDL (C) e HDL (D) em soro de ratos controle e ratos submetidos ao modelo experimental de SM. **P*<0.05, ***P*<0.01 e ****P*<0.001 comparado ao grupo controle. $^{\#\#}P$<0.01 e $^{\#\#\#}P$<0.001 comparado o grupo II. Met- Metformina, DHL- Dieta hiperlipídica e STZ- Streptozotocina.

4. CONCLUSÕES

O uso de extrato de *P. catteianum* resultou na prevenção de alterações lipídicas encontradas em modelo animal de SM induzida. Sendo assim, podemos sugerir o extrato deste fruto como potencial agente terapêutico ou preventivo desta importante doença metabólica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATISTA, K. S. et al. Beneficial effects of consumption of acerola, *cashew* or *guava* processing by-products on intestinal health and lipid metabolism in dyslipidaemic female Wistar rats. **British Journal of Nutrition**. Newcastle, v. 119, n.1, p.30-41, 2018.

BOMBELLI, M. et al. Uric acid and risk of new-onset metabolic syndrome, impaired fasting glucose and diabetes mellitus in a general Italian population: data from the Pressioni Arteriose Monitorate E Loro Associazioni study, **Journal of Hypertension**. Milan, v.36, n.7, p.1492-1498, 2018.

GUPTA, N. Et al. Childhood Obesity in Developing Countries: Epidemiology, Determinants, and Prevention, **Endocrine Reviews**. Washington, DC, v.33, n.1, p.48-70, 2012.

KIM, Y.; KEOGH, J. B.; CLIFTON, P. M. Polyphenols and Glycemic Control. **Nutrients**, Adelaide, v.8, n. 17, p.1-27, 2016.

OLIVEIRA, P. S. et al. Brazilian native fruit extracts act as preventive agents modulating the purinergic and cholinergic signalling in blood cells and serum in a rat model of metabolic syndrome. **Archives of Physiology and Biochemistry**, London, p.1-8, 2020.

OLIVEIRA, P. S. O. et al. *Eugenia uniflora* fruit (red type) standardized extract: a potential pharmacological tool to diet-induced metabolic syndrome damage management, **Biomedicine & Pharmacotherapy**. Columbia, v.92, p.935-941, 2017.

OLIVEIRA, P. S. et al. Southern Brazilian native fruit shows neurochemical, metabolic and behavioral benefits in an animal model of metabolic syndrome. **Metabolic Brain Disease**, Morgantown, v.33, n.5, p.1551-1562, 2018.

PEREIRA, A. S. et al. *Psidium cattleianum* fruits: A review on its composition and bioactivity. **Food Chemistry**, Norwich, v.258, p.95-103, 2018.

POSSA, J. **Compostos bioativos e capacidade antioxidante de araçás (*Psidium cattleianum sabine*) morfotipo amarelo e vermelho cultivados no Rio Grande do Sul.** 2016. 45p. Dissertação (Graduação em Nutrição) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ROCHLANI, Y. et al. Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. **Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease**. London, v.11, n.8, p.215–225, 2017.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

EFEITO DO EXTRATO DE *PSIDIUM CATTLEIANUM* NO PERFIL LIPÍDICO EM MODELO ANIMAL DE SÍNDROME METABÓLICA

RAPHAELA CASSOL PICCOLI[1]; JULIANE DE SOUZA CARDOSO [2]; REJANE GIACOMELLI TAVARES[2]; FRANCIELI MORO STEFANELLO [2]; FERNANDA CARDOSO TEIXEIRA[2]; MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES[3]

Predisposição ao desenvolvimento de diabetes *mellitus* tipo 2 **&** Risco elevado para desenvolvimento de doenças cardiovasculares

Dislipidemia
Deposição central de gordura
Hipertensão arterial sistêmica

Resistência à insulina
Hiperinsulinemia
Intolerância a glicose



Ratos Wistar macho adultos****

Síndrome metabólica induzida por DHL**+STZ***



↓ Colesterol total

↓ Lipoproteína de baixa densidade - LDL

↓ Lipoproteína de muito baixa densidade - VLDL

Pré-tratamento

Ação antidiabética e Antioxidante

Compostos bioativos:
-Carotenoides;
-Antocianinas:



Extrato de *Psidium cattleianum* (200mg/kg)*

*Administrado uma vez ao dia por via intragástrica; **DHL: dieta hiperlipídica (ofertada durante três semanas); ***STZ: streptozotocina (injeção intraperitoneal (35mg/kg) em dose única);
****Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEA n° 5747/2015).

EFEITO DO EXTRATO DE MIRTILO NO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO E NOS NÍVEIS DO TNF-α EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE DEPRESSÃO

SARA KESKE[1]; LUIZA SPOHR[1]; KARINA PEREIRA LUDUVICO[2]; NATÁLIA PONTES BONA[2]; MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES[1]; ROSELIA SPANEVELLO[1,3]

[1]Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer - UFPel – saarakeske@gmail.com
[1]Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer - UFPel – luizaspohr@hotmail.com
[2]Laboratório de Biomarcadores - UFPel – karina_luduvico@outlook.com
[2]Laboratório de Biomarcadores - UFPel – natinhabona@hotmail.com
[1]Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer - UFPel – mspereirasoares@gmail.com
[1,3]Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer - UFPel – rspanevello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O Transtorno Depressivo Maior (TDM), também conhecido popularmente como depressão, é uma patologia psicossomática grave. Essa desordem se caracteriza por sintomas como humor deprimido, anedonia, alterações em funções neurovegetativas, entre outros. O TDM é o principal contribuinte para o suicídio, que é a causa de morte de aproximadamente 800.000 pessoas por ano no mundo (OMS, 2018).

Dentre as alternativas de tratamento está a terapia psicológica e a abordagem farmacológica. Contudo, sabe-se que os atuais medicamentos para a patologia possuem efeitos adversos significativos, podendo culminar em uma baixa adesão ao tratamento. Portanto, busca-se novas alternativas terapêuticas. Diante deste quadro destaca-se o mirtilo, o qual contém um percentual elevado de antocianinas, como também outros compostos fenólicos. As antocianinas conferem aos frutos colorações avermelhadas e azuladas. Além disso, são compostos com potencial antioxidante podendo exercer efeito neuroprotetor, evitando, por exemplo, a neuroinflamação (SHUKITT-HALE et al. 2012).

Nos últimos anos a inflamação foi relacionada com o TDM (HOWREN et al. 2009). Dentre as respostas inflamatórias está o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF)-α. Não obstante, constatou-se que o fator apresenta relação com o TDM (DOWLATI et al. 2010). Portanto, este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos do extrato de mirtilo em camundongos submetidos ao comportamento tipo-depressivo induzido pelo lipopolissacarídeo (LPS) mediante teste comportamental e mensuração dos níveis de (TNF)-α em córtex cerebral, hipocampo e estriado

2. METODOLOGIA

2.1 Preparação do extrato de mirtilo

Os frutos de mirtilo (*Vaccinium virgatum*) foram obtidos pela Embrapa Clima Temperado. O extrato foi preparado de acordo com a metodologia descrita por

BORDIGNON et al. (2009). Os extratos foram filtrados, rotaevaporados e liofilizados até a secura.

2.2 Modelo animal de depressão e protocolo de prevenção com extrato de mirtilo

Utilizou-se camundongos *Swiss* adultos, mantidos em condições experimentais controladas. Esses animais foram divididos em cinco grupos: I (controle), II (LPS), III (LPS + fluoxetina 20 mg/kg), IV (LPS + extrato de mirtilo 100 mg/kg) e V (LPS + extrato de mirtilo 200 mg/kg). Nos primeiros sete dias, os animais foram pré-tratados com veículo, fluoxetina ou extrato de mirtilo por via oral uma vez ao dia. No sétimo dia também receberam salina ou LPS via intraperitoneal (JIANG et al. 2017; SPOHR et al. 2019). No oitavo dia, foram submetidos ao teste de suspensão da cauda e em seguida à eutanásia, onde o córtex cerebral, hipocampo e o estriado foram coletados para posterior análise bioquímica (CEEA nº 32979-2019).

2.3 Teste de suspensão da cauda

O teste de suspensão da cauda foi conduzido de acordo com a metodologia descrita por STERU et al. (1985) objetivando avaliar o comportamento tipo-depressivo. Os camundongos foram suspensos pela cauda, cerca de 50 cm do chão, com o auxílio de fita adesiva. O tempo total de suspensão foi de seis minutos, consistindo em dois minutos de adaptação e os quatro últimos para mensuração de movimentos realizados pelos animais.

2.4 Níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF-α)

A determinação dos níveis de TNF-α nas estruturas cerebrais foi realizada utilizando kit de ensaio imunoenzimático (ELISA) adquirido da BD Biosciences. A concentração de TNF-α nas amostras foi determinada de acordo com as instruções do fabricante e foi expressa como pg/mg de proteína.

2.5 Análise estatística dos dados

Os resultados obtidos foram avaliados através de ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando $P<0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de suspensão da cauda é muito utilizado na pesquisa de novas alternativas terapêuticas para o TDM a fim de avaliar se a nova substância teria vantagem em relação aos tratamentos farmacológicos padrões. Observou-se no teste de suspensão da cauda (Fig.1) que o grupo LPS obteve um tempo de imobilidade maior que o grupo controle. Contudo, em relação aos animais que receberam extrato de mirtilo nas doses de 100 mg/kg e 200 mg/kg houve uma redução significativa no tempo de imobilidade. Não obstante, constatou-se que a maior dose do extrato apresentou redução mais significativa, superando inclusive o fármaco fluoxetina utilizado no tratamento do TDM.

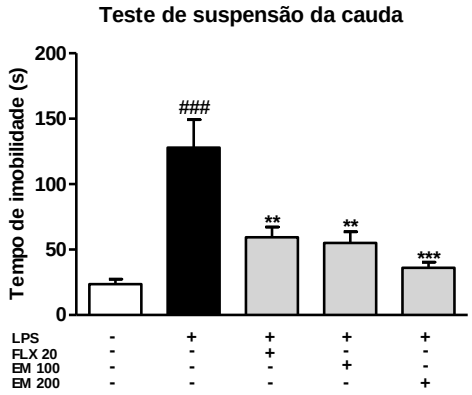


Figura 1: Efeito do pré-tratamento com fluoxetina ou extrato de mirtilo no comportamento tipo-depressivo induzido por LPS obtido através do teste da suspensão da cauda. (###) Denota P<0,05 em comparação com o grupo controle. (**) P<0,01 e (***) P<0,001 quando comparado com o grupo LPS.

Quanto aos resultados obtidos pela mensuração de TNF-α, observou-se que o grupo LPS obteve níveis mais elevados que o grupo controle. Em córtex cerebral, a administração de extrato de mirtilo e fluoxetina foram capazes de atenuar essa alteração. Já em hipocampo, somente o extrato de mirtilo foi eficaz frente à alteração induzida pelo LPS.

Estas estruturas cerebrais foram escolhidas por estarem envolvidas no comportamento emocional, o qual é alterado no TDM. Também existe uma relação do TNF-α com o hipocampo, uma vez que ele diminui a neurogênese (RÉUS et al. 2015), culminando na redução desta estrutura a longo prazo (BELLEAU et al. 2019). Pelo fato de o TNF-α estar envolvido na neuroinflamação (SHUKITT-HALE et al. 2012), podemos sugerir que o extrato de mirtilo tenha capacidade neuroprotetora, uma vez que reduziu os níveis dessa citocina pró-inflamatória em córtex cerebral e hipocampo. No entanto, faz-se necessário a realização de novas pesquisas com fim corroborativo.

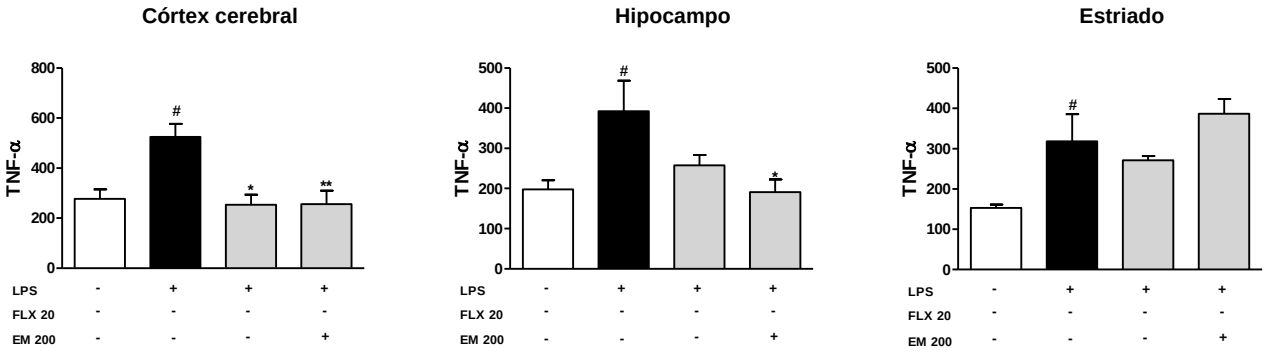


Figura 2: Figura 2: Efeito do pré-tratamento com fluoxetina ou extrato de mirtilo nos níveis de TNF no córtex, hipocampo e estriado, em modelo experimental tipo-depressivo induzido por LPS.
(###) Denota *P*<0,001 comparado com o grupo controle. (**) *P*<0,01 e (***) *P*<0,001 comparado com o grupo LPS.

4. CONCLUSÕES

Infere-se que o extrato de mirtilo possibilitou a prevenção do comportamento tipo-depressivo, assim como a redução nos níveis da citocina de resposta inata (TNF-α), demonstrando efeito neuroprotetor frente ao episódio tipo-depressivo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BORDIGNON JR., C.L.; FRANCESCATTO, V.; NIENOW, A.A.; CALVETE, E.; REGINATTO, F.H. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, p.183-188, 2009.

JIANG, X.; LIU, J.; LIN, Q.; MAO, K.; TIAN, F.; JING, C.; WANG, C.; DING, L.; PANG, C. Proanthocyanidin prevents lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice via neuroinflammatory pathway. **Brain Research Bulletin**, v.135, p.40-46, 2017.

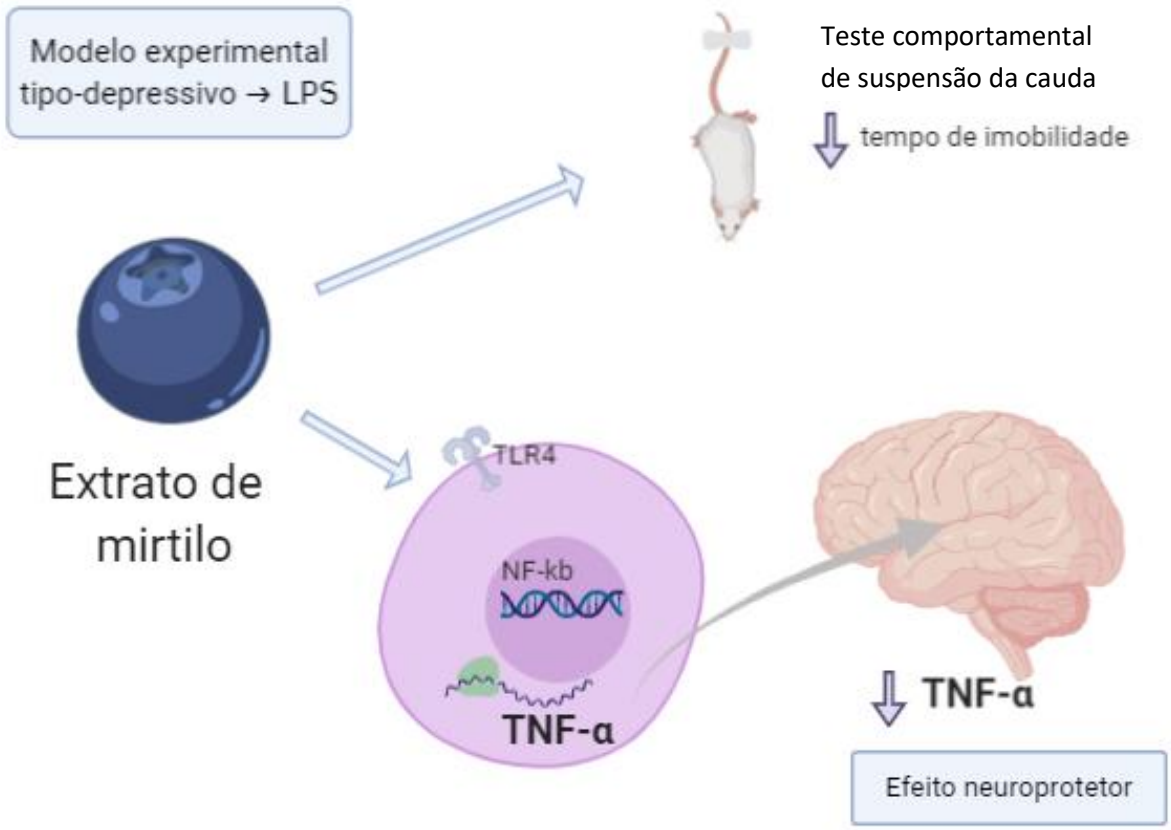
SPOHR, L.; SOARES, M.S.P.; OLIVEIRA, P.S.; DE MATTOS, B.S.; BONA, N.P.; PEDRA, N.S.; TEIXEIRA, F.C.; DO COUTO, C.A.T.; CHAVES, V.C.; REGINATTO, F.H.; LISBOA, M.T.; RIBEIRO, A.S.; LENCINA, C.L.; STEFANELLO, F.M.; SPANEVELLO, R.M. Combined actions of blueberry extract and lithium on neurochemical changes observed in an experimental model of mania: exploiting possible synergistic effects. **Metabolic Brain Disease**, v.34, n.2, p.605-619, 2019.

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v.85, p.367-370, 1985.

MA, K.; ZHANG, H.; BALOCH, Z. Pathogenetic and Therapeutic Applications of Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α) in Major Depressive Disorder: A systematic Review. **International Journal of Molecular Sciences,** v.17 (5), p. 733-754**,** 2016.

EFEITO DO EXTRATO DE MIRTILO NO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO E NOS NÍVEIS DO TNF-α EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE DEPRESSÃO

SARA KESKE; LUIZA SPOHR; KARINA PEREIRA LUDUVICO; NATÁLIA PONTES BONA; MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES; ROSELIA SPANEVELLO



EXTRATO DE MIRTILO PREVINE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICAS SÉRICAS EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A UM MODELO COMPORTAMENTAL DO TIPO-DEPRESSIVO INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO

SOLANGE VEGA CUSTÓDIO[1]; NATÁLIA PONTES BONA[2], ANITA AVILA DE SOUZA[2], KARINA PEREIRA LUDUVICO[2]; ROSELIA MARIA SPANEVELLO[2], LUIZA SPOHR[2], MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES[2,3]

[1]Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brazil – solangevegacustodio@gmail.com
[2] Laboratório de Neuroquímica, Inflamação, e Câncer, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brazil
[3]Universidade Federal de Pelotas – mspereirasoares@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) é uma desordem neuropsicológica grave e crônica caracterizada por alterações de humor, da função neurovegetativa, da percepção, bem como ansiedade e comportamento suicida e atinge cerca de 4,4% da população mundial (OMS, 2017). O tratamento para o TDM é baseado na combinação de farmacoterapia com a psicoterapia (CUIJPERS et al. 2010). Entretanto, sintomas adversos associados aos antidepressivos são frequentemente relatados colaborando para a diminuição de adesão ao tratamento (BRATS, 2012).

Estudos demonstraram que genes ligados à resposta anti-inflamatória estão bastante alterados em pacientes com TDM (CARVALHO et al. 2014; TREADWAY et al. 2019). Ademais, o dano oxidativo está relacionado com a morte neuronal por apoptose ou através da agregação de proteínas oxidadas, processos que podem resultar na insuficiência de mecanismos estabilizadores de humor. Logo, tem sido sugerido que a inflamação crônica e o estresse oxidativo podem acompanhar um estado depressivo. Além disso, os sintomas do TDM se relacionam com alterações metabólicas como as alterações glicêmicas e lipídicas e podem favorecer a obesidade e Diabetes Mellitus tipo 2 (TALLBOT; NOUWEN, 2000).

O mirtilo (*Vaccinium virgatum*) possui elevado teor em antocianinas que têm apresentado benefícios à saúde devido propriedades antioxidantes, que atuam contra os radicais livres, bem como anti-inflamatórias. Estudos indicam que uma dieta equilibrada associada à um consumo frequente de polifenois tem sido eficaz na prevenção de inúmeras patologias, incluindo a prevenção ou tratamento de doenças neuropsiquiátricas (DEBOM et al. 2016; SPOHR et al. 2019). Logo, o mirtilo é um importante composto a ser estudado, visto que o sistema estresse/inflamação estão relacionados com a fisiopatologia do TDM.

Assim, considerando que o TDM é a mais prevalente e uma das mais debilitantes desordens neuropsicológicas, além de sua terapia causar muitos efeitos adversos, este estudo tem como objetivo investigar o potencial efeito protetor do extrato de mirtilo sobre alterações comportamentais e bioquímicas séricas em camundongos submetidos a um modelo experimental do tipo-depressivo induzido por lipopolissacarídeo (LPS).

2. METODOLOGIA

Após a aprovação pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) (CEEA 32979-2019), camundongos Swiss machos adultos (60 dias, 40-50 g) foram obtidos e mantidos no Biotério Central de Animais da UFPEL. O modelo experimental de comportamento tipo-depressivo e protocolo de prevenção com extrato de mirtilo teve duração de uma semana. Durante sete dias, os animais foram pré-tratados com veículo (n=10), fluoxetina (20 mg/kg n=10) ou extrato de mirtilo (100 e 200 mg/kg n=10) por via oral uma vez ao dia. No 7° dia de tratamento, eles receberam veículo ou LPS (830 µg/kg) via intraperitoneal de maneira a induzir o episódio tipo-depressivo. No dia seguinte, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto para avaliar a atividade locomotora dos animais e ao nado forçado para avaliar o comportamento tipo-depressivo e em seguida à eutanásia.

As determinações bioquímicas de glicose, colesterol total, colesterol lipoproteínas de alta densidade (HDL) e lipoproteínas de baixa densidade (LDL), foram realizadas com amostras de soro usando kits comercialmente disponíveis (Labtest® e Bioclin). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Tukey. Um valor de $P \leq 0,05$ foi considerado como diferença estatisticamente significante. Todos os dados foram expressos como média ± erro padrão da média.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 1 é possível observar que o tratamento com extrato de mirtilo foi capaz de prevenir o aumento do tempo de imobilidade no teste do nado forçado induzido pelo LPS, demonstrando o seu potencial efeito do tipo-antidepressivo. Além disso, não houve alteração na atividade locomotora em nenhum grupo experimental (Figura 1).

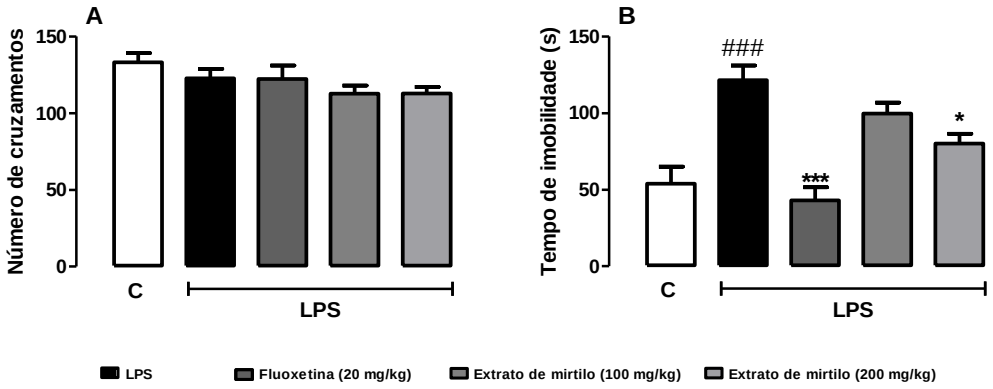


Figura 1: Atividade locomotora (A) e comportamento tipo-depressivo (B) de camundongos induzidos com LPS e tratados com fluoxetina e extrato de mirtilo ### P<0,001 diferente do grupo controle e * P<0,05 e *** P<0,001 diferente grupo LPS.

Quanto aos parâmetros bioquímicos, o tratamento com extrato de mirtilo (200mg/kg), foi capaz de prevenir a redução dos níveis de glicose induzido pelo LPS (Figura 2A). Tal redução pode ser explicada devido a diminuição do consumo alimentar pelos animais do grupo LPS nas últimas 24h com consequente redução da glicemia. Além disso, a endotoxina bacteriana

também é responsável por aumentar a glicólise em muitos tipos de células, sendo capaz de causar hipoglicemia (BROOKS et al. 2014).

Por outro lado, o pré-tratamento com fluoxetina ou extrato de mirtilo não foram capazes de reduzir o aumento dos níveis séricos de coleterol total (Figura 2C) e colesterol LDL (Figura 2D) causado pelo LPS. Em relação aos níveis de colesterol HDL, nossos achados demonstraram que o extrato de mirtilo foi capaz de prevenir a diminuição dos níveis plasmáticos dessa lipoproteína (Figura 2D). Corroborando com este achado, CURTIS et al. (2019) constataram que o consumo de uma xícara de mirtilos por dia pelos participantes foi capaz de melhorar a função vascular e o status lipídico, com redução de 12 a 15% no risco de doença cardiovascular.

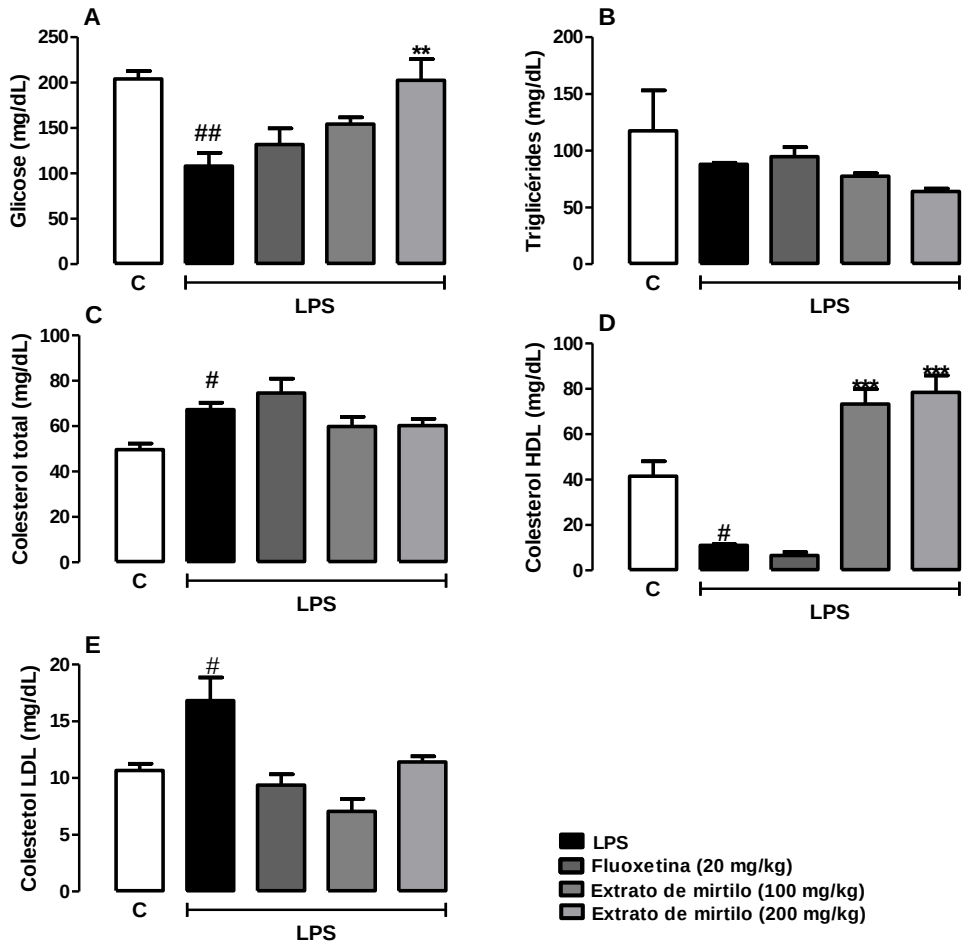


Figura 2: Níveis de glicose (A), triacilgliceróis (B), colesterol total (C) e frações (D e E) em soro de camundongos induzidos com LPS e tratados com fluoxetina e extrato de mirtilo. #P<0,05, ##P<0,01 diferente do controle, **P<0,01, ***P<0,01 diferente do LPS.

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, foi possível demonstrar o potencial protetor do extrato de mirtilo em modelo animal do tipo-depressivo induzido pela administração intraperitoneal de LPS. Além disso, esses dados incentivam

a possibilidade da utilização do extrato de mirtilo em pacientes com TDM, além de fomentar a pesquisa para a utilização deste extrato em outros modelos comportamentais a fim de elucidar os seus exatos mecanismos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

WHO – World Health Organization. Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. 2017.

BRATS – Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde. Antidepressivos no Transtorno Depressivo Maior em Adultos. 2012.

BROOKS, G.F.; CARROLL K.C.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A.; MIETZNER, T.A. **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg**. Porto Alegre: AMGH. 2014.

CUIJPERS, P., VAN STRATEN, A., HOLLON, S. D. ANDERSSON, G. The contribution of active medication to combined treatments of psychotherapy and pharmacotherapy for adult depression: a meta-analysis. **Acta Psychiatric Scandinavica**, v.121, n. 6, p. 415–423, 2009.

CARVALHO, L.A.; BERGINK, V.; SUMASKI, L.; WIJKHUIJS, J.; HOOGENDIJK, W.J.; BIRKENHAGER, T.K. DREXHAGE, H.A. Inflammatory activation is associated with a reduced glucocorticoid receptor alpha/beta expression ratio in monocytes of inpatients with melancholic major depressive disorder. **Translational Psychiatry**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2014.

TALBOT, F.; NOUWEN, A. A Review of the Relationship Between Depression and Diabetes in Adults: Is there a link? **Diabetes Care**, v. 23, n. 10, p. 1556-1562, 2000.

DEBOM, G.; GAZAL, M.; SOARES, M.S.P.; COUTO, C.A.T.; MATTOS, B.; LENCINA, C.; KASTER, M.P.; GHISLENI, G.C.; TAVARES, R.; BRAGANHOL, E.; CHAVES, V.C.; REGINATTO, F.H.; STEFANELLO, F.; SPANEVELLO, R.M. Preventive effects of blueberry extract on behavioral and biochemical dysfunctions in rats submitted to a model of manic behavior induced by ketamine. **Brain Research Bulletin**, n. 127, p. 260-269, 2016.

SPOHR, L.; SOARES, M.S.P.; OLIVEIRA, P.S.; MATTOS, B.S.; BONA, N.P.; PEDRA, N.S.; TEIXEIRA, F.C.; COUTO, C.A.T.; CHAVES, V.C.; REGINATTO, F.H.; LISBOA, M.T.; RIBEIRO, A.S.; LENCINA, C.L.; STEFANELLO, F.M.; SPANEVELLO, R.M. Combined actions of blueberry extract and lithium on neurochemical changes observed in an experimental model of mania: exploiting possible synergistic effects. ***Metabolic Brain Disease***, v. 34, p. 605-619, 2019.

CURTIS, P.J.; VELPEN, V.; BERENDS, L.; JENNINGS, A.; FEELISCH, M.; UMPLEBY, A.M.; EVANS, M.; FERNANDEZ, B.O.; MEISS, M.S.; MINNION, M.; POTTER, J.; MINIHANE, A.M.; KAY, C.D.; RIMM, E.B.; CASSIDY, A. Blueberries improve biomarkers of cardiometabolic function in participants with metabolic syndrome—results from a 6-month, double-blind, randomized controlled trial, **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 109, p. 1535–1545, 2019.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

Extrato de mirtilo previne alterações comportamentais e bioquímicas séricas em camundongos submetidos a um modelo comportamental do tipo-depressivo induzido por lipopolissacarídeo

SOLANGE VEGA CUSTÓDIO[1]; NATÁLIA BONA PONTES[2], ANITA AVILA DE SOUZA[2], KARINA PEREIRA LUDUVICO [2], ROSELIA MARIA SPANEVELLO[2], LUIZA SPOHR[2], MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES[2,3]

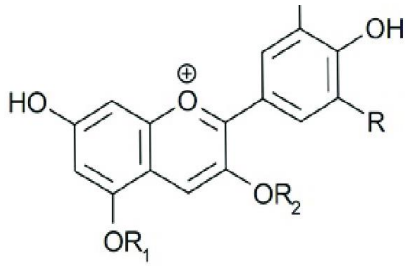


(*Vaccinium virgatum*)

Extração



Extrato etanólico de mirtilo



Efeito tipo-antidepressivo → Comportamento tipo-depressivo

Previne → Hipoglicemia

Aumenta → Colesterol total e colesterol LDL ↑

Aumenta → Colesterol HDL ↑



Camundongos Swiss machos adultos

LPS 830 µg/kg

Pré-tratamento por via intragástrica por sete dias

Extrato de mirtilo (100 e 200 mg/kg)

EFEITO DE *Rubus* sp. SOBRE NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO, LIPOPEROXIDAÇÃO E ATIVIDADE DA CATALASE EM ESTRIADO DE ANIMAIS SUBMETIDOS AO MODELO DE DIABETES TIPO 2

TAYNÁ AMARAL VELEDA[1], JULIANE DE SOUZA CARDOSO[2], ALANA SEIXAS DE FARIAS[3], FERNANDA CARDOSO TEIXEIRA[4], CLAITON LEONETI LENCINA[5], FRANCIELI MORO STEFANELLO[6]

[1]*Universidade Federal de Pelotas - taynaaveleda@gmail.com*
[2]*Universidade Federal de Pelotas - ju.souza591@gmail.com*
[3]*Universidade Federal de Pelotas - alanaseixas510@gmail.com*
[4]*Universidade Federal de Pelotas - fe.t@hotmail.com*
[5]*Universidade Federal de Pelotas - claiton.ufpel@gmail.com*
[6]*Universidade Federal de Pelotas - fmstefanello@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

Diabetes *Melittus* tipo 2 (DM2), segundo a Associação Americana de Diabetes, é caracterizada por uma combinação de resistência à ação da insulina e resposta secretora de insulina compensatória insuficiente (ADA, 2014). Essa doença aumenta consideravelmente o risco de acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca, doença arterial obstrutiva periférica e doença microvascular, afetando significativamente a expectativa e qualidade de vida, além de aumentar o risco de morte (BRASIL, 2019). A DM2 é uma patologia multifatorial normalmente associada ao estresse oxidativo, o qual está relacionado com as complicações secundárias da DM podendo contribuir com danos a biomoléculas como os lipídeos, proteínas e DNA (RAMAKRISHNA e JAILKHANI, 2008). O estado hiperglicêmico crônico favorece a manifestação do estresse oxidativo a partir do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e/ou redução da eficácia do sistema de defesa antioxidante (PATEL et al., 2016).

Considerando o papel do estresse oxidativo na patogênese da DM2, torna-se interessante a busca por novos compostos que tenham ação antioxidante e que possam prevenir as complicações dessa doença metabólica. Nesse contexto, destaca-se o *Rubus* sp., conhecido popularmente como amora-preta, fruto pertencente à família Rosaceae e gênero *Rubus*, rico em compostos bioativos, principalmente ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas e carotenoides (FERREIRA et al., 2010). Esses compostos, individualmente ou combinados, possuem alta capacidade antioxidante, e são responsáveis por vários benefícios à saúde, como prevenção de distúrbios inflamatórios, doenças cardiovasculares e vários tipos de câncer (SKROVANJOVA et al., 2015).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do extrato de *Rubus* sp. sobre os níveis de ERO, mensuração da lipoperoxidação e

atividade da enzima antioxidante catalase (CAT) em estriado de ratos submetidos ao modelo experimental de DM2.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização do protocolo experimental, ratos Wistar adultos machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), foram divididos em 4 grupos: (I) controle; (II) DM2 + água; (III) DM2 + metformina e (IV) DM2 + *Rubus* sp. Com exceção do grupo (I), os animais receberam dieta hiperlipídica (DHL) por três semanas seguida de dose única de estreptozotocina (STZ) (35 mg/kg via intraperitoneal) para indução da DM2. Os grupos III e IV receberam metformina (250 mg/kg) e extrato hidroalcóolico de frutos de *Rubus sp*. (200 mg/kg), respectivamente, pela via intragástrica, uma vez ao dia durante todo protocolo experimental, já os grupos I e II receberam água. Todos os procedimentos realizados foram autorizados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEA n° 4757/2015). Após esse período experimental, os animais foram eutanasiados, o cérebro removido para separação do estriado, que foi então homogeneizado em tampão adequado para as análises bioquímicas. Os níveis de ERO foram avaliados conforme metodologia descrita por ALI et al. (1992). A lipoperoxidação foi avaliada pela determinação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com ESTERBAUER e CHEESEMAN (1990). E por fim, a atividade da enzima CAT foi avaliada de acordo com AEBI (1984). Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism 5, por ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey, considerando $P<0,05$ como diferença significativa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 1 estão representados os níveis de ERO, TBARS e atividade da enzima CAT em estriado cerebral dos ratos. É possível visualizar que houve um aumento nos níveis de ERO no grupo (II) comparado ao grupo controle. Por outro lado, o uso de metformina e extrato de *Rubus* sp. foi eficaz em prevenir esse aumento (Fig 1A). Na figura 1B, pode-se observar um aumento nos níveis de TBARS no grupo (II) e a prevenção desse aumento com o uso de metformina e extrato de *Rubus* sp. Em relação a atividade da enzima CAT, houve uma diminuição no grupo de animais diabéticos sem tratamento (II), porém, nos grupos que receberam metformina e extrato de *Rubus* sp a diminuição da atividade foi prevenida.

Entre vários tipos de complicações associadas ao estresse oxidativo induzido por DM2, as mais importantes são as complicações cardiovasculares, neuropatia e nefropatia. O malondialdeído (MDA) é formado como resultado da lipoperoxidação, importante dano causado à membrana das células devido ao

excesso de ERO. O MDA reage como ácido tiobarbitúrico e, com isso, os níveis de TBARS podem ser usados para medir a extensão do dano oxidativo a lipídeos (REHMAN e AKASH, 2017). Ao prevenir o aumento dos níveis de TBARS, o extrato de *Rubus* sp. demonstrou uma importante atividade antioxidante. Um estudo realizado por DE SOUZA et al. (2014) demonstrou que a atividade antioxidante total de diversos frutos vermelhos estava correlacionada ao seu conteúdo fenólico. Vale destacar que, dentre os frutos avaliados, *Rubus* sp. demonstrou a maior atividade antioxidante e mais elevado conteúdo fenólico, como flavonoides, antocianinas e carotenoides (DE SOUZA et al., 2014). Em outro estudo, realizado por IRUDAYARAJ et al. (2012), o extrato das folhas de *Toddalia asiatica* (TALEe) demonstrou importante efeito hipoglicemiante e antioxidante pois aumentou a atividade de enzimas antioxidantes, dentre elas a CAT. A avaliação fitoquímica de TALEe mostrou a presença de alcaloides, terpenoides, cumarinas, flavonoides e outros compostos fenólicos (IRUDAYARAJ et al., 2012). Diante desses resultados, entende-se que os efeitos do extrato de *Rubus* sp. na prevenção do aumento dos níveis de ERO e TBARS e no reestabelecimento da atividade da enzima CAT em estriado de animais com DM2 induzida por DHL e STZ, deve-se à sua composição fenólica.

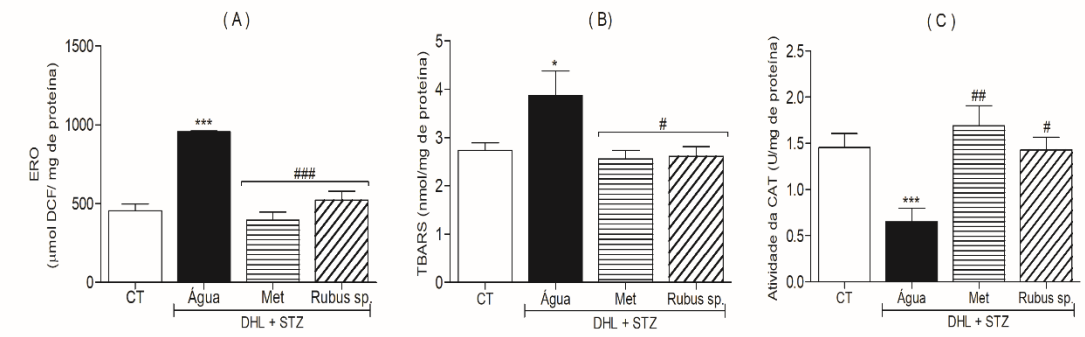


Figura 1: Efeito do extrato de *Rubus* sp. nos níveis de ERO (A), TBARS (B) e atividade da enzima CAT (C) em estriado de ratos controle e ratos submetidos ao modelo experimental de DM2. Dados expressos como média ± erro padrão (n=4-9). **P*<0,05 e ****P*<0,001 comparado ao grupo controle. #*P*<0,05, ##*P*<0,01 e ###*P*<0,001 comparado o grupo DM2/veículo. ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey. CAT- catalase, CT- controle, DHL- dieta hiperlipídica, ERO- espécies reativas de oxigênio, Met- metformina, STZ- estreptozotocina e TBARS- substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

4. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados nesta pesquisa demonstram que o extrato de *Rubus* sp. foi eficaz em proteger contra o estresse oxidativo induzido em estriado no modelo animal de DM2. Com isso, podemos concluir que *Rubus* sp. possui importante atividade antioxidante, podendo vir a ser um potencial tratamento preventivo contra DM2 e suas complicações.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADA. Diagnosis and Classification of Diabetes *Mellitus*. American Diabetes Association; **Diabetes Care**. Jan. 2014; Acessado em: 29 jul. 2020. Online. Disponível em: https://doi.org/10.2337/dc14-S081

AEBI H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

ALI SF, LEBEL CP, BOND SC. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 13, p. 637-648, 1992.

BRASIL. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020. 2019.

DE SOUZA, V. R.; PEREIRA, P. A.; DA SILVA, T. L.; DE OLIVEIRA LIMA, L. C.; PIO, R.; QUEIROZ, F. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. **Food Chemistry**, v. 156, p. 362–368, 2014.

ESTERBAUER H, CHEESEMAN KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 407–421, 1990.

FERREIRA, D. S.; ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. Compostos bioativos presentes em amora-preta (*Rubus* spp.) **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 32, p. 664-674, 2010.

IRUDAYARAJ, S. S.; SUNIL, C.; DURAIPANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Antidiabetic and antioxidant activities of *Toddalia asiatica* (L.) Lam. leaves in streptozotocin induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 515–523, 2012.

PATEL, T.P.; RAWAL, K.; BAGCHI, A.K.; AKOLKAR, G.; BERNARDES, N.; DIAS, D.S.; GUPTA, S.; SINGAL, P.K. Insulin resistance: an additional risk factor in the pathogenesis of cardiovascular disease in type 2 diabetes. **Heart Failure Reviews**, v. 21, p. 11-23, 2015.

RAMAKRISHNA, V. JAILKHANI, R.; Oxidative stress in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) patients. **Acta Diabetol**, v. 45, p. 41-46, 2007.

REHMAN, K. & AKASH, M. S. H. Mechanism of Generation of Oxidative Stress and Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus: How Are They Interlinked? **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 118, p. 3577–3585, 2017.

SKROVANJOVA, S.; SUMCZYNSKI, D.; MLCEK, J.; JURIKOVA, T.; SOCHOR, J. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 24673–24706, 2015.

Graduação

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA

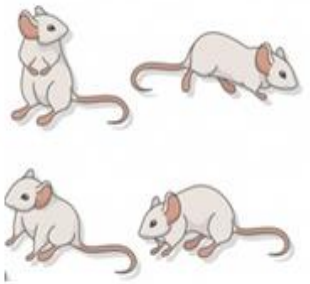
Saúde única

IV MOSTRA ACADÊMICA

PPGB

EFEITO DE *Rubus* sp. SOBRE NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO, LIPOPEROXIDAÇÃO E ATIVIDADE DA CATALASE EM ESTRIADO DE ANIMAIS SUBMETIDOS AO MODELO DE DIABETES TIPO 2

TAYNÁ AMARAL VELEDA[1]; JULIANE DE SOUZA CARDOSO[2], ALANA SEIXAS DE FARIAS[3], FERNANDA CARDOSO TEIXEIRA[4], CLAITON LEONETI LENCINA[5]; FRANCIELI MORO STEFANELLO[6]



(CEEA n° 5747/2015)

- (I) Controle
- (II) DM2* + água
- (III) DM2*+ metformina** (250 mg/kg)
- (IV) DM2*+ *Rubus* sp.** (200 mg/kg)

DIABETES TIPO 2

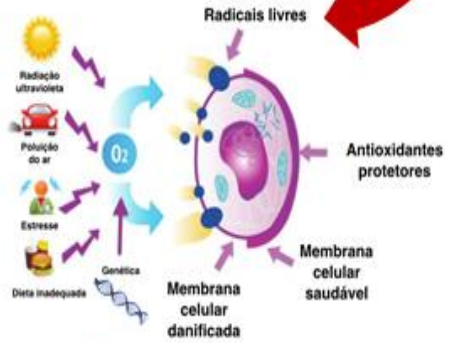
- AVC
- Insuficiência cardíaca
- Estresse oxidativo
- Entre outras



Extrato hidroalcóolico de *Rubus* sp.

Compostos fenólicos - **atividade antioxidante** e antidiabética

Protegeu contra



Aumento de ERO***
Aumento de TBARS
Diminuição da atividade CAT#
EM ESTRIADO DE RATOS

*Indução da DM2 (Diabetes *mellitus* 2) - Dieta hiperlipídica (3 semanas) + estreptozotocina (35 mg/kg i.p., dose única)
**administrados via intragástrica uma vez ao dia durante todo período experimental
***ERO - Espécies reativas de oxigênio #CAT - Catalase

AVALIAÇÃO DE UMA SERINO PROTEASE COM ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA SOBRE OS TEMPOS DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

VANESSA MIRANDA[1]; KETHYLEN CARDOSO[2], ROMERO BRANDÃO[3], ANA LEITE[4], THIAGO NASCIMENTO[5], ANA PORTO[6]

[1]Universidade Federal de Pernambuco - andradevanessa.vm@gmail.com
[2]Universidade Federal Rural de Pernambuco - kethybarbara@gmail.com
[3]Universidade de Pernambuco - romero_brandao@yahoo.com.br
[4]Universidade Federal de Pernambuco - acllb2003@yahoo.com.br
[5]Universidade Federal Rural de Pernambuco – thiago_pajeu@hotmail.com
[6]Universidade Federal Rural de Pernambuco – analuporto@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Proteases fibrinolíticas são enzimas que degradam a fibrina principal componente do coágulo sanguíneo. Essas enzimas podem ser produzidas por microrganismos e tem o potencial de inibir a coagulação sanguínea. Os fungos demonstraram ser uma boa fonte dessas enzimas, com possibilidade de produção em larga escala, facilitando a produção e a purificação deste bioproduto. Nos últimos anos, tem sido dada especial atenção à produção, avaliação da toxicidade aguda, genotoxicidade e citotoxicidade em diferentes linhagens celulares de enzimas fibrinolíticas que têm um alto potencial de degradar o coágulo de fibrina usando o gênero *Mucor*, especialmente a espécie *Mucor subtilissimus* (NASCIMENTO et al., 2015, 2017; SILVA et al. 2019).

A utilização de métodos coagulômetros para avaliação da atividade anticoagulante de proteases, baseiam-se na formação do coágulo de fibrina, que pode ser visualizado no tubo, através das técnicas manuais, ou detectado fotometricamente, através dos aparelhos denominados coagulômetros. Os métodos coagulométricos avaliados são: Tempo de Protrombina (TP), tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPa), Tempo de Trombina (TT), pesquisa de anticoagulante circulante, dosagem de fibrinogênio e dosagem de fatores (ZAGO, 2013). Dessa forma, o presente trabalho visa compreender a avaliação do TTPa, TT e TP sobre o plasma tratado com uma serino protease produzida pelo *Mucor subtillissimus* UCP 1262.

2. METODOLOGIA

2.1 Obtenção da protease fibrinolítica

O microrganismo utilizado para a produção da enzima foi o fungo filamentoso *Mucor subtilissimus* UCP 1262 (SISGEN AA30B0B). A preparação do inóculo, a produção da enzima fibrinolítica por fermentação em estado sólido e a extração enzimática foi realizada conforme descrito por NASCIMENTO et al. (2015). Quanto a purificação a mesma foi realizada por cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex A50 de acordo com NASCIMENTO et al. (2017).

2.2 Determinação dos tempos de coagulação

Os tempos de TP e TTPa foram realizados em um coagulômetro semi-automático BFT II. Foi utilizado um plasma padrão para os testes fornecido pelo próprio fabricante. Os controles dos ensaios de TP e TT foram realizados com 20µL e 50µL de solução salina (NaCl, 0,9%) e 100µL de plasma, incubados por 60 segundos, com subsequente adição de 50µL do reagente RecombilPlastin 2G. O controle do ensaio de TTPa foi realizado com 20µL e 50µL de solução salina, 100µL de plasma e 50µL do reagente para TTPa (APTT-SP (liquid)), incubado por 180 segundos e subsequente adição de 50 µL de cloreto de cálcio 0,025M. Para avaliação do efeito anticoagulante, a protease fibrinolítica purificada foi utilizada em diferentes concentrações de 0,5mg/mL, 1mg/mL, 1,5mg/mL, 2mg/mL e 2,5mg/mL. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos em função de R (razão tempo de coagulação da amostra sobre o tempo de coagulação do controle). Para a avaliação do TT foi utilizada a formação de trombos *in vitro* conforme a metodologia de WANG et al. (2011) com algumas modificações. Primeiramente 50 µL da protease fibrinolítica (1 mg/mL) foi colocada em contato com 100 µL de trombina (20 U/mL) por 5, 10 e 30 min, logo após esse período, cada tempo teve a solução transferida para eppendorfs (2 mL) contendo uma mistura de 400 µL de 150 mM de Tris-HCl-NaCl pH 7,75, 100 µL de tampão fosfato de 245 mM pH 7,0 e 0,72% de fibrinogênio bovino, sendo colocado em banho maria a 37ºC até observação da formação do coágulo de fibrina.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade anticoagulante foi avaliada através dos tempos de coagulação: TTPa para a avaliação da via intrínseca e TP presente na via extrínseca. Os ensaios mostraram que a protease fibrinolítica produzida pelo *Mucor subtilissimus* UCP 1262 promoveu um tempo prolongado significativo sobre o tempo de coagulação do TP conforme o aumento da concentração da enzima (Figura 1A). Curva semelhante foi obtida graficamente pela serino protease extraída das folhas de *Leucas indica*, a lunatrombase, que em uma concentração de 500 nM aumentou significativamente o TP (GOGOI, et al., 2018). O TP mede os fatores envolvidos na via extrínseca e na via comum (FVII, X, II e Fibrinogênio), sendo independente da via intrínseca.

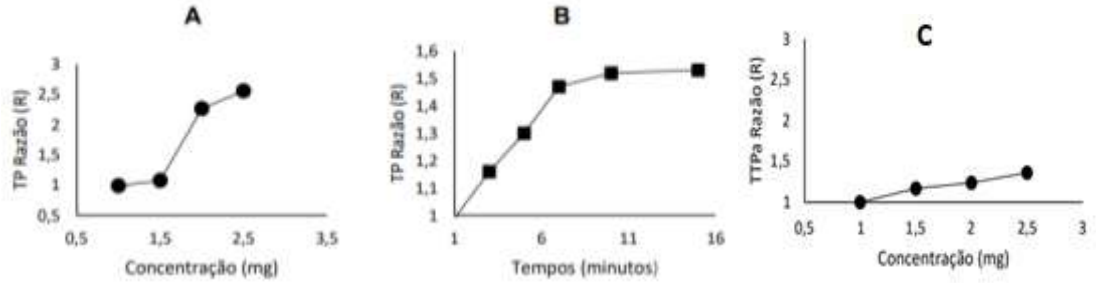


Figura 1A - Tempo de protrombina (TP) em função da concentração da protease fibrinolítica (mg). R = Relação entre o tempo de coagulação da enzima e o tempo de coagulação de controle. Figura 1B - Tempo de protrombina (TP) da protease

fibrinolítica em função do tempo (minutos). R = Relação entre o tempo de coagulação da enzima e o tempo de coagulação de controle. Figura C - Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa). R = Relação entre o tempo de coagulação da amostra e o tempo de coagulação de controle.

Foi utilizada a concentração de 1 mg/mL para se verificar o acompanhamento da atividade da protease fibrinolítica sobre o TP no plasma sanguíneo ao longo do tempo (Figura 1B). Nesse ensaio de TP pode ser observado que a serino protease prolongou o tempo de coagulação até os 7 primeiros minutos, passado esse período houve uma razão constante do tempo, não tendo mais efeito da enzima com relação ao tempo. No ensaio TTPa, a enzima praticamente não prolongou o tempo de coagulação, mesmo com o aumento da concentração da enzima como pode ser observado na Figura 1C. Resultados semelhantes foram observados por GOGOI et al. (2018) onde a serino protease extraída das folhas de *Leucas indica* não afetou o TTPa, o que mostra que a protease fibrinolitica produzida pelo *Mucor subtilissimus* UCP 1262 não tem quaisquer efeito sobre a via intrínseca e via comum da coagulação sanguínea.

No TT foi avaliada se a enzima produzida pelo *Mucor subtilissimus* UCP 1262 alteraria o tempo necessário para a formação do coágulo após a adição da trombina. Dessa forma foi verificada que em todos os tempos de contato com a trombina, seja 5, 10, ou 30 minutos não houve qualquer interferência sobre a ação da trombina ou do fibrinogênio sobre a formação dos trombos.Dessa forma, como somente o TP entre todos os estudados foi que sofreu alteração, no caso um prolongamento do seu tempo sugerindo que a protease fibrinolítica em estudo afeta a via extrínseca da coagulação.

Nossos resultados indicam que a serino protease produzida pelo *Mucor subtilissimus* UCP 1262 pode bloquear a ativação da cascata de coagulação inibindo a interação com o fator VII, sabe-se que esse fator é secretado pelos hepatócitos na sua forma de zimogênio sendo conhecido como gene da proteína 2 de ligação ao ácido hialurônico (HABP2), trata-se de uma serino protease plasmática circulante e que possui diversos efeitos na hemostasia, biologia vascular, inflamação e câncer e que uma vez ativado ele pode ser inibido por vários inibidores de proteases circulantes (BYSKOV et al., 2020) e como demonstrado no nossos estudos pela serino protease produzida pelo *Mucor subtilissimus* UCP 1262. Já se tem conhecimento da ação hidrolítica da protease semelhante a plasmina, ou seja atuando diretamente sobre a fibrina (NASCIMENTO et al., 2017) entretanto, alguns dos seus comportamentos diferem quanto a plasmina em condições fisiológicas, pois a enzima fibrinolitica estudada degrada especificamente a fibrina, e não os outros componentes sanguíneos como o fibrinogênio, fator V e fator VIII que são degradados pela plasmina. Dessa forma, a enzima fibrinolítica não altera o tempo de trombina (TT) no qual é influenciado pela concentração de fibrinogênio e pela presença de inibidores da fibrino formação (BYSKOV et al., 2020).

4. CONCLUSÕES

Dessa forma foi possível observar que a serino protease obtida pelo *Mucor subtilissimus* UCP 1262 promoveu um tempo prolongado significativo sobre o tempo de coagulação do TP conforme ocorria o aumento da concentração da enzima, porém a serino protease não provocou quaisquer tipo de alteração no TT e TTPa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BYSKOV, K.; GALL, S.M. L.; THIEDE, B.; CAMERER, E.; KANSE, S. M. Protease activated receptors (PAR)-1 and -2 mediate cellular effects of factor VII activating protease (FSAP). **The Faseb Journal**, [s.l.], v. 34, n. 1, p. 1079-1090, jan. 2020.

GOGOI, D.; ARORA, N.; KALITA, B.; SARMA, R.; ISLAM, T.; GHOSH, S. S.; DEVI, R.; MUKHERJEE, A. K. Anticoagulant mechanism, pharmacological activity, and assessment of preclinical safety of a novel fibrin(ogen)olytic serine protease from leaves of *Leucas indica*. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 1-17, 18 abr. 2018.

NASCIMENTO, T.P.; SALES, A.E.; PORTO, C. S. Production and characterization of new fibrinolytic protease from *Mucor subtillissimus* UCP 1262 in solid-state fermentation. **Advances in Enzyme Research**, v. 3, n. 3, p. 81-91, 2015.

NASCIMENTO, T.P.; SALES, A.E.; PORTO, T.S.; BRANDAO, R.M.P.; BREYDO, L.; UVERSKY, V.; PORTO, A.L.F.; CONVERTI, A. Purification, biochemical, and structural characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Mucor subtilissimus* UCP 1262. **Bioprocess and Biosystems Engineering,** p. 1, 2017.

SILVA, M.M.; ROCHA, T.A.; MOURA, D.F.; CHAGAS, C.A.; AGUIAR JÚNIOR, F.C.A.; SANTOS, N.P.S.; SOBRAL, R.V.S.; NASCIMENTO, J.M.; LEITE, A.C.L.; PASTRANA, L.; COSTA, R.M.P.B.; NASCIMENTO, T.P.; PORTO; A.L.F. Effect of acute exposure in swiss mice (*Mus musculus*) to a fibrinolytic protease produced by *Mucor subtilissimus* UCP 1262: An histomorphometric, genotoxic and cytological approach. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 103, p. 282–291, 2019.

WANG S., Z. DENG, Q. LI, X. GE, Q. BO, J. LIU, J. CUI, X. JIANG, J. LIU, L. ZHANG, M. HONG, A novel alkaline serine protease with fibrinolytic activity from the polychaete Neanthes japonica, Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology. 159 (2011) 18–25.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R.; SPECTOR, N.; COVAS, D.T.; REGO, E.M. **TRATADO DE HEMATOLOGIA.** São Paulo: Atheneu, 2013.

Graduação

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

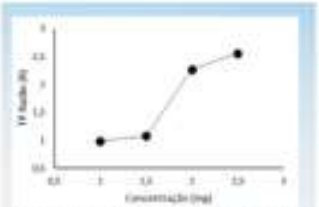
PPGB

AVALIAÇÃO DE UMA SERINO PROTEASE COM ATIVIDADE FIBRINOLITICA SOBRE OS TEMPOS DE COAGULAÇÃO SANGUINEA

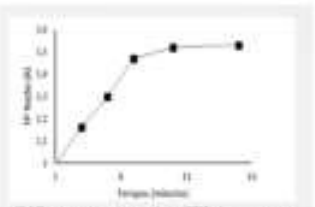
VANESSA MIRANDA[1]; KETHYLEN CARDOSO[2], ROMERO BRANDÃO[3], ANA LEITE[4], THIAGO NASCIMENTO[5], ANA PORTO[6]



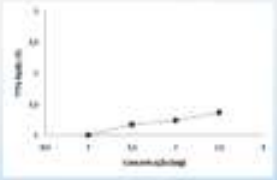
DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE COAGULAÇÃO



(A) Tempo de protrombina(TP) em função da concentração da protease fibrinolitica(mg)



(B) Tempo de protrombina(TP) da protease fibrinolitica em função do tempo(minutos)



(C) Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa)

ÁCIDO TÂNICO PROTEGE CONTRA OS DANOS OXIDATIVOS RENAIS CAUSADOS PELA HIPERMETIONINEMIA AGUDA

BERNARDO DE MORAES MEINE[1]; NATÁLIA PONTES BONA[2]; LUIZA SPOHR[2]; FERNANDO LOPEZ ALVEZ[2]; MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES[2]; FRANCIELI MORO STEFANELLO[3]

[1]Universidade Federal de Pelotas - bemeine15@hotmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas - mspereirasoares@gmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas - nataliapbona@gmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas - luizaspohr@hotmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas - fernando.lopez.alvez@hotmail.com
[3]Universidade Federal de Pelotas – fmstefanello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A hipermetioninemia é um erro inato do metabolismo caracterizado pelo acúmulo tecidual e plasmático do aminoácido metionina (Met) e de seus metabólitos como a metionina sulfóxido (MetO) (MUDD, 2011). Nessa doença, os pacientes podem apresentar sintomas variados, especialmente alterações neurológicas e hepáticas. Além disso, recentemente o nosso grupo de pesquisa demonstrou que os rins sofrem alterações oxidativas após a administração de Met e/ou MetO (SOARES et al., 2016). Ademais, o rim participa como principal regulador das concentrações plasmáticas de aminoácidos (GUEUTIN, 2020).

Embora os mecanismos envolvidos na fisiopatologia dessa desordem ainda não estejam completamente esclarecidos, diversos estudos recentes têm demonstrado o envolvimento do sistema colinérgico, purinérgico e inflamatório além da presença de estresse oxidativo na patogênese da hipermetioninemia (STEFANELLO, 2009 ; SOARES, 2020).

Nesse contexto, compostos isolados de produtos naturais com ação antioxidante podem ser alvos promissores no manejo clínico e prevenção das alterações encontradas em pacientes hipermetioninêmicos. Dessa maneira, destaca-se o ácido tânico, um polifenol hidrolisado com sua atividade extensamente retratada na literatura, variando de capacidade neuroprotetora (GERZSON et al., 2019; LUDUVICO et al., 2020), antitumoral (BONA, 2019) e principalmente antioxidante (ANDRADE, 2005 ; GULÇIN, 2010).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito preventivo do ácido tânico frente a alterações em marcadores de estresse oxidativo nos rins de ratos submetidos ao protocolo experimental de hipermetioninemia aguda.

2. METODOLOGIA

2.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar obtidos do Biotério Central da UFPel, os quais foram mantidos em ambiente com temperatura (20-24ºC) e umidade (40-60%) controladas, água e alimento *ad libitum* e ciclo claro/escuro de 12 h. Todos os procedimentos envolvendo os animais foram aprovados pelo Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPel (CEEA 3527).

2.2.

Modelo experimental de hipermetioninemia e tratamento com ácido tânico

Os ratos receberam ácido tânico (30 mg/kg por via intragástrica) ou água por 7 dias e após foram divididos em 4 grupos experimentais: grupo I - controle, grupo II - ácido tânico 30 mg/Kg, grupo III - Mix (Metionina 0,4 g/Kg e Metionina sulfóxido 0,1 g/Kg) e grupo IV - ácido tânico 30 mg/Kg + Metionina 0,4 g/Kg e Metionina sulfóxido 0,1 g/Kg. Aos 29 dias de vida, os ratos dos grupos III e IV receberam uma injeção subcutânea de Met + MetO após o pré-tratamento com ácido tânico e os do grupo I e II receberam salina. Três horas após as administrações dos aminoácidos ou salina os animais foram submetidos à eutanásia e os rins foram dissecados e armazenados para as posteriores análises bioquímicas.

2.3. Avaliação de marcadores de estresse oxidativo

Os rins foram homogeneizados em tampão fosfato de sódio 20 mM contendo 140 mM de KCl (pH 7,4) e centrifugados a 3500 rpm por 5 min. O sobrenadante foi utilizado para avaliar os seguintes parâmetros: níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS) (ALI et al., 1992) e níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (ESTERBAUER & CHEESEMAN, 1990). Também foi analisada a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) (MISRA & FRIDOVICH, 1972).

2.4. Análise estatística dos dados

Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando $P<0,05$. Todos os dados foram expressos como média ± erro padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como demonstrado na Figura 1, os níveis de EROS ($P<0,001$) e TBARS ($P<0,05$) foram significativamente aumentados no grupo Mix (Met + MetO), entretanto o pré-tratamento com ácido tânico foi capaz de prevenir o aumento de EROS ($P<0,01$). Além disso, a atividade da SOD foi diminuída significativamente no grupo Mix ($P<0,01$), porém o pré-tratamento com ácido tânico preveniu essa diminuição ($P<0,05$).

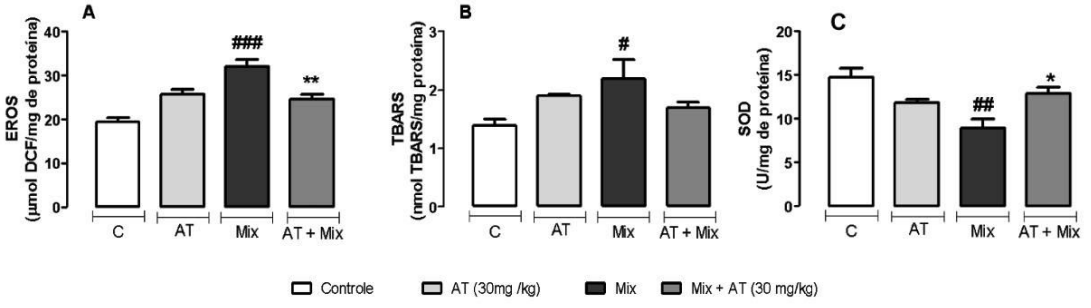


Figura 1: Efeito do pré-tratamento com ácido tânico (AT) 30 mg/kg sobre os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS) (A), peroxidação lipídica (TBARS) (B) e atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) (C) em rins de ratos jovens submetidos ao modelo experimental de hipermetioninemia aguda. $^{\#}P<0,05$; $^{\#\#\#}P<0,001$ diferente do grupo controle. ** $P<0,01$ diferente do grupo Mix (Met + MetO).

Cabe salientar que o tecido renal pode ser diretamente afetado por elevadas concentrações de aminoácidos, como encontrado na hipermetioninemia, uma vez que este é responsável pela eliminação de produtos formados durante o metabolismo dos aminoácidos. Sendo assim, é de extrema importância que novos agentes com potencial terapêutico sejam capazes de proteger os rins contra os danos causados pela hipermetioninemia.

Além disso, assim como encontrado no presente trabalho, diversos estudos já relataram o envolvimento do estresse oxidativo na patogênese de doenças renais crônicas (DAENEN, 2019). Nesse sentido, o efeito protetor do ácido tânico frente ao estresse oxidativo causado pela Met+MetO é de extrema importância, uma vez que auxilia a restabelecer a homeostase renal e prevenir a evolução para alterações mais graves. A capacidade do ácido tânico já é bem estabelecida na literatura (BASU, 2018), e além disso já foi demonstrado que o ácido tânico é capaz de proteger os rins de danos oxidativos causados pelo anticarcinogênico cisplatina (AKOMOLAFE, 2014).

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que o ácido tânico preveniu o aumento de EROS e a diminuição da atividade da SOD decorrentes do acúmulo de metionina e metionina sulfóxido. Sendo assim, pode ser considerado um importante alvo na prevenção de alterações renais presentes em pacientes hipermetioninêmicos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKOMOLAFE, S.F. et al. Phenolic Acids (Gallic and Tannic Acids) Modulate Antioxidant Status and Cisplatin Induced Nephrotoxicity in Rats. **International Scholarly Research Notices**. 2014: p. 1-8, 2014.

ALI, S.F. et al. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. **Neurotoxicology**. v. 13, p.637-648, 1992.

ANDRADE, R.G. et al. The antioxidant effect of tannic acid on the in vitro copper-mediated formation of free radicals. **Archives of Biochemistry Biophysics**, v. 437, n. 1, p. 1-9, 2005.

BASU, T. et al. A natural antioxidant, tannic acid mitigates iron-overload induced hepatotoxicity in Swiss albino mice through ROS regulation. **Environmental Toxicology**, v. 33, p. 603-618, 2018.

BONA, N.P. et al. Tannic acid elicits selective antitumoral activity in vitro and inhibits cancer cell growth in a preclinical model of glioblastoma multiforme. **Metabolic Brain Disease**, v. 35, p. 283-293, 2020.

DAENEN, K. et al. Oxidative stress in chronic kidney disease. **Pediatric Nephrology**, v. 34, c. 6, p. 975-991, 2019.

ESTERBAUER, H., CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 407-421, 1990.

GERZSON, M.F.B. et al. Tannic Acid Ameliorates STZ-Induced Alzheimer's Disease-Like Impairment of Memory, Neuroinflammation, Neuronal Death and Modulates Akt Expression. **Neurotoxicity Research**, v. 37, p.1009-1017, 2020.

GUEUTIN, V. et al. Physiologie rénale [Renal physiology]. **Bulletin du Cancer**, v. 99, n. 3, p. 237-249, 2012.

GÜLÇIN, I. et al. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 3, n. 1, p. 43-53, 2010.

LUDUVICO, K.P. et al. Antidepressant Effect and Modulation of the Redox System Mediated by Tannic Acid on Lipopolysaccharide-Induced Depressive and Inflammatory Changes in Mice. **Neurochemical Research**, in press, 2020.

MISRA, H.P., FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, p. 3170-3175, 1972.

MUDD, S.H. Hypermethioninemias of genetic and non-genetic origin: a review. **American Journal of Medical Genetics Part C (Seminars in Medical Genetics)**, v. 157, p. 3-32, 2011.

SOARES, M.S.P. et al. Chronic administration of methionine and/or methionine sulfoxide alters oxidative stress parameters and ALA-D activity in liver and kidney of young rats. **Amino Acids**, v. 49, n. 1, p. 129-138, 2016.

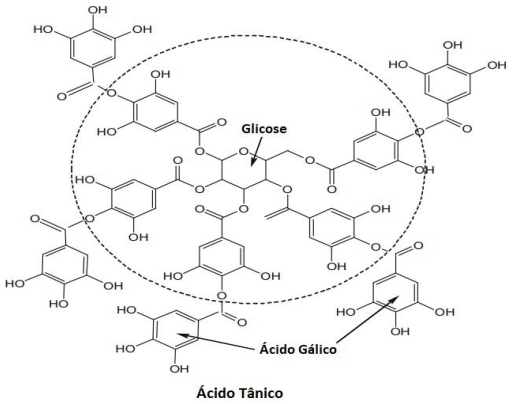
SOARES, M.S.P. et al. Hypermethioninemia induces memory deficits and morphological changes in hippocampus of young rats: implications on pathogenesis. **Amino Acids**, v. 52, n. 3, p. 371–385, 2020.

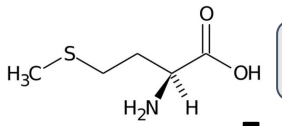
STEFANELLO, F.M. et al. Hypermethioninemia provokes oxidative damage and histological changes in liver of rats. **Biochimie**, v. 91, n. 8, p. 961–968, 2009.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

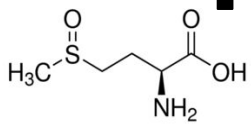
ÁCIDO TÂNICO PROTEGE CONTRA OS DANOS OXIDATIVOS RENAIS CAUSADOS PELA HIPERMETIONINEMIA AGUDA

BERNARDO DE MORAES MEINE[1]; NATÁLIA PONTES BONA[2]; LUIZA SPOHR[2]; FERNANDO LOPEZ ALVEZ[2]; MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES[2]; FRANCIELI MORO STEFANELLO[3]





Metionina (Met)



Metionina sulfóxido (MetO)

Ácido tânico 30 mg/kg
(Via intragástrica)

7 dias de pré-tratamento

Mix (Met +MetO)
(via subcutânea)

3 horas

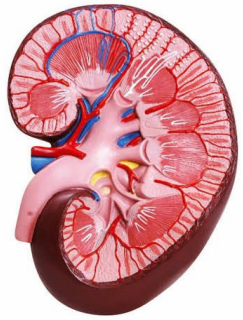


Ratos Wistar jovens

CEEA
UFPel
(3527)

Met + MetO

- Espécies reativas de oxigênio (EROS) ↑
- Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) ↑
- Superóxido dismutase (SOD) ↓



Ácido Tânico

- Espécies reativas de oxigênio (EROS) ↓
- Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) ↓
- Superóxido dismutase (SOD) ↑

ÁCIDO TÂNICO PROTEGE CONTRA DANO OXIDATIVO RENAL CAUSADO PELA HIPERMETIONINEMIA AGUDA

NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS EM AMINOACIDOPATIAS

BERNARDO DE MORAES MEINE[1]; ANITA ÁVILA DE SOUZA[2]; ALANA SEIXAS DE FARIA[2]; ROSELIA MARIA SPANEVELLO[2]; MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES[2]; FRANCIELI MORO STEFANELLO[3]

[1]Universidade Federal de Pelotas - bemeine15@hotmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas - anita_a_avila@hotmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas - alana_seixasfarias@hotmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas - rspanevello@gmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas - mspereirasoares@gmail.com
[3]Universidade Federal de Pelotas - fmstefanello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Erros inatos do metabolismo (EIMs) são um grupo de distúrbios metabólicos hereditários causados por mutações em genes específicos que levam à redução ou até mesmo ausência na síntese de proteínas ou enzimas. Essas alterações estão relacionadas com desequilíbrio na homeostase tecidual associadas a diferentes vias metabólicas (SCATURRO et al., 2013).

Os EIMs foram classificados em diferentes categorias, e uma classe desses distúrbios são caracterizados por uma deficiência em algum aminoácido específico, denominando-se aminoacidopatias. Dentre as aminoacidopatias é possível destacar três que possuem uma incidência e relevância clínica maior: fenilcetonúria (PKU), doença do xarope de bordo (DXB) e homocistinúria (HCU) (WASIM et al., 2017).

Na PKU ocorre um defeito na enzima fenilalanina hidroxilase (PAH), tornando-a incapaz de metabolizar a fenilalanina, gerando níveis altíssimos deste aminoácido, o que pode acarretar em complicações neurológicas se não for tratada (MITCHELL et al., 2011).

Na DXB ocorre uma deficiência da atividade do complexo da desidrogenase dos α-cetoácidos de cadeia ramificada (CACR) que afeta o metabolismo dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina (BCAAs), aumentando muito seus níveis séricos, gerando algumas complicações como falha no desenvolvimento, alterações neurológicas e dificuldade na alimentação (BLACKBURN et al., 2017)

A HCU é causada pela deficiência da enzima cistationina β-sintase (CBS), levando a um acúmulo anormal de homocisteína e seus metabólitos (como a metionina) no sangue e na urina, chegando a níveis 100 vezes maiores que o normal desses aminoácidos, podendo levar a complicações neurológicas e hepáticas (ANSARI et al., 2014).

Dessa forma, frente ao exposto, o objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica sobre abordagens terapêuticas inovadoras para as aminoacidopatias supracitadas.

2. METODOLOGIA

Foi realizada uma revisão bibliográfica, sendo analisados artigos científicos de periódicos nas bases de dados Medline, PubMed e Google acadêmico. Foram selecionadas referências dos anos de 2014 a 2020 e que se enquadraram nos nossos objetivos. Foram usados os descritores: erros inatos do metabolismo, aminoacidopatias, fenilcetonúria, doença do xarope de bordo, homocistinúria, tratamento, terapia.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontrados 25 artigos. Desses, foram selecionados 3 artigos pois apresentavam novas alternativas terapêuticas para as aminoacidopatias fenilcetonúria, doença do xarope do bordo e homocistinúria.

Um estudo conduzido por Isabelle e colaboradores (2018) teve o objetivo de desenvolver uma cepa bacteriana sintética (SYNB1618), utilizando o genoma da Escherichia coli Nissle como molde, com a capacidade de expressar genes que codificam enzimas metabolizadoras de fenilalanina para ser usada como um probiótico com atividade controlada no tratamento da PKU (ISABELLA et al., 2018).

A cepa sintética, SYNB1618, foi administrada ao modelo de camundongo PAH enu2/enu2 PKU (modelo de fenilcetonúria), onde a cepa reduziu a concentração de fenilalanina no sangue dos animais em 38% em comparação com o controle, independentemente da ingestão de proteínas na dieta. A cepa também foi administrada em macacos cynomolgus saudáveis, onde se observou que ela foi capaz de diminuir os níveis séricos de fenilalanina após um desafio alimentar com esse aminoácido por via oral (ISABELLA et al., 2018).

Outro estudo analisado utilizou o fenilbutirato de sódio, um fármaco para tratar distúrbios do ciclo da uréia, em pacientes com formas variadas de DXB (BURRAGE et al., 2014). Foi demonstrado que esse fármaco reduziu o nível de BCAAs dos pacientes tratados, pois foi capaz de ativar uma subunidade previamente inativada da enzima CACR, diminuindo as complicações dessa doença nos pacientes (BURRAGE et al., 2014).

O terceiro estudo analisado criou uma terapia enzimática promissora, que utiliza uma versão modificada da CBS humana, a OT-58, que não possui um sítio regulador, permitindo que a atividade catalítica da enzima funcione com mais precisão e sem interrupção, teoricamente aumentando a capacidade da enzima ao metabolizar a homocisteína (BUBLIL et al., 2019).

Além disso, foi realizado um teste pré-clínico em modelos de camundongo knockout para CBS (KO), onde a OT-58 foi capaz de reduzir o nível de Hcy a um nível similar aos camundongos controles, e foi capaz de manter 100% dos camundongos KO tratados continuamente vivos, onde nenhum dos camundongos KO tratados com veículo sobreviveram (BUBLIL et al., 2019).

4. CONCLUSÕES

Devido às informações apresentadas acima, é possível concluir que mesmo as aminoacidopatias sendo doenças subdiagnosticadas e com poucas opções de tratamento, diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de desenvolver novas opções terapêuticas para pessoas que sofrem com esses distúrbios, e os resultados parecem promissores no que tange a farmacoterapia dos EIM.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSARI, R. et al. Hyperhomocysteinemia and neurologic disorders: A review. **Journal of Clinical Neurology** , v. 10, n. 4, p. 281–288, 2014.

BLACKBURN, P. R. et al. Maple syrup urine disease: Mechanisms and management. **Application of Clinical Genetics**, v. 10, p. 57–66, 2017.

BUBLIL, E. et al. Classical homocystinuria: From cystathionine beta-synthase deficiency to novel enzyme therapies. **Biochimie**, 2019.

BURRAGE, L. C. et al. Sodium phenylbutyrate decreases plasma branched-chain amino acids in patients with urea cycle disorders. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 113, n. 1, p. 131–135, 2014.

ISABELLA, V. M. et al. Development of a synthetic live bacterial therapeutic for the human metabolic disease phenylketonuria. **Nature Biotechnology**, v. 36, n. 9, p. 857–867, 2018.

MITCHELL, J. J. et al. Phenylalanine hydroxylase deficiency. **Genetics in Medicine**, v. 13, n. 8, p. 697–707, 2011.

SCATURRO, G. et al. Newborn screening of inherited metabolic disorders by tandem mass spectrometry: past, present and future. **Medical and Surgical Pediatrics**, v. 35, n. 3, p. 105–109, 2013.

WASIM, M. et al. Aminoacidopathies: Prevalence, Etiology, Screening, and Treatment Options. **Biochemical Genetics**, v. 56, n. 1–2, p. 7–21, 2018.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS EM AMINOACIDOPATIAS

BERNARDO DE MORAES MEINE[1]; ANITA ÁVILA DE SOUZA[2]; ALANA SEIXAS DE FARIA[2]; ROSELIA MARIA SPANEVELLO[2]
MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES[2]; FRANCIELI MORO STEFANELLO[3]

Aminoacidopatias
Fenilcetonúria (PKU)
Doença do xarope do bordo (DXB)
Homocistinúria (HCU)



Tratamentos?

MEDLINE Google acadêmico PubMed

Isabella et al., 2018

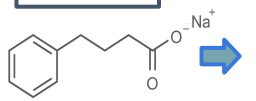
SYNB1618

Ratos PAH enu2/enu2 PKU → Redução de **38%** da fenilalanina sérica

Macacos Cynomolgus saudáveis → Redução da fenilalanina após um desafio alimentar

Burrage et al., 2014

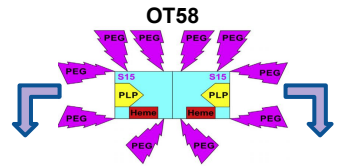
Fenilbutirato de sódio



BCAAs em pacientes tratados

Ativa uma subunidade da enzima previamente inativada → **Possível aliado no tratamento da DXB**

Bublil et al., 2019



Camundongo KO +OT58 → **Todos vivos após tratamento contínuo com OT58**

Camundongo KO Controle → **Nenhum controle permaneceu vivo**

Nova terapêutica para o auxílio de pacientes homocistinúricos

Quantificação das interleucinas IL-1-β e IL-17E durante co-cultivo de de macrófago THP-1 com *Trichophyton rubrum* simulando uma infecção sistêmica

BRUNA ALINE MICHELOTTO CANTELLI[1]; GABRIELA GONZALEZ SEGURA[2], TAMIRES APARECIDA BITENCOURT[3], MARIANA HEINZEN DE ABREU[4], ANA LÚCIA FACHIN[5].

[1] *UNAERP – brucantelli@hotmail.com*
[2]*UNAERP- gabrielagonzalezsegura@hotmail.com*
[3] *UNAERP- mariheinzen@gmail.com*
[4] *USP- tabitencourt@gmail.com*
[5] *UNAERP- afachin@unaerp.br*

1. INTRODUÇÃO

As infeções fungicas são causadas por fungos patogênicos que acometem animais e principalmente seres humanos. Esses fungos filamentosos possuem a capacidade de invadir estruturas queratinizadas, como pele, cabelos e unhas como fonte de nutrição (KHURANA; SARDANA; CHOWDHARY, 2019). Dentre os fungos causadores de dermatofitoses em humanos, o fungo filamentoso *T. rubrum (Trichophyton rubrum)* é o principal causador de infecções cutâneas de pés, unhas e corpo (ANTUORI *et al.*, 2019).

As dermatófitoses são frequentemente superficiais, porém podem se tornar graves quando associada à outros problemas de saúde (BONGOMIN *et al.*, 2017), atuando na piora do prognóstico do paciente, onde ocorre a disseminação dessa patologia dependendo da área do corpo infectado e do estado imunológico do hospedeiro.

Os pacientes com o sistema imunológico debilitado, geralmente sofrem com dermatofitoses invasivas e profundas, embora essa infecção seja rara, ela pode ser fatal. Ao invadir o tecido, os patógenos alcançam camadas profundas, como a derme e a hipoderme e se disseminam, pela proximidade dessas camadas, nos linfonodos, cérebro e corrente sanguínea (LANTERNIER *et al.*, 2013).

O processo inflamatório é uma resposta utilizada para defender o organismo contra os patógenos, onde a inflamação é uma tentativa de proteção, na qual o organismo vai tentar eliminar os patógenos. Esse processo inicia-se com a ativação de fosfolipases, que degradam os lipídios da membrana celular liberando ácido araquidônico e mediadores inflamatórios, como as citocinas (QUINTANS *et al.*, 2019).

As citocinas são um grupo amplo de proteínas de sinalização que são produzidas por células imunes em áreas lesadas, atuando nas células vizinhas ou nas próprias células que os produzem. Dentre as citocinas, podemos citar as interleucinas (IL) que também são proteínas produzidas e secretadas por células do sistema imune, que atuam na comunicação celular e no combate a infecção.

2. METODOLOGIA

2.1 Co-cultivo

Foi utilizada a linhagem de monócito humano denominada de THP-1, diferenciada em macrófago utilizando 12,5 ng/mL de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) em 24h de cultivo em meio RMPI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal com antibióticos (Penicilina-estreptomicina na concentração de 100 unidades de penicilina e 100 mg/mL estreptomicina e canamicina foi cultivada em estufa contendo 5% de CO_2 na temperatura de 37º C.

O cultivo da linhagem de *T.rubrum* foi realizado em meio de cultura Sabouraud Dextrose agar por 15 dias a 28º C, segundo os métodos previamente descritos por (FACHIN *et al.*, 2006). A solução de conídios foi preparada na concentração $1x10^7$ conídio/mL em hematímetro, em seguida foram incubadas em 50 mL de meio Sabourad líquido e foram incubados num agitador orbital por 7h para germinação dos conídios (CANTELLI *et al.*, 2017).

Os dois organismos (macrófagos e *T. rubrum*) foram reunidos e mantidos em estufa de CO_2 5% a 37ºC por 24 h. Após o período de incubação, o sobrenadante foi utilizado para realizar a quantificação das interleucinas.

2.2 Quantificação de interleucinas

A quantificação da IL-17E e IL-1β foi realizada em duplicata em dois experimentos independentes com o kit ELISA Development Mini TMB EDK (PeproTech), segundo recomendações do fabricante e como descreve (BOMFIM *et al.*, 2017). A análise estatística dos dados foi Pared t test, realizada no programa prisma.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 descreve a quantificação das interleucinas IL-17E e IL-1β, onde podemos observar que houve maior liberação de IL-1 β maior durante o co-cultivo, quando comparado com o cultivo de macrófagos (controle). Para o IL-17E não foi observado diferença de liberação entre o co-cultivo e o controle.

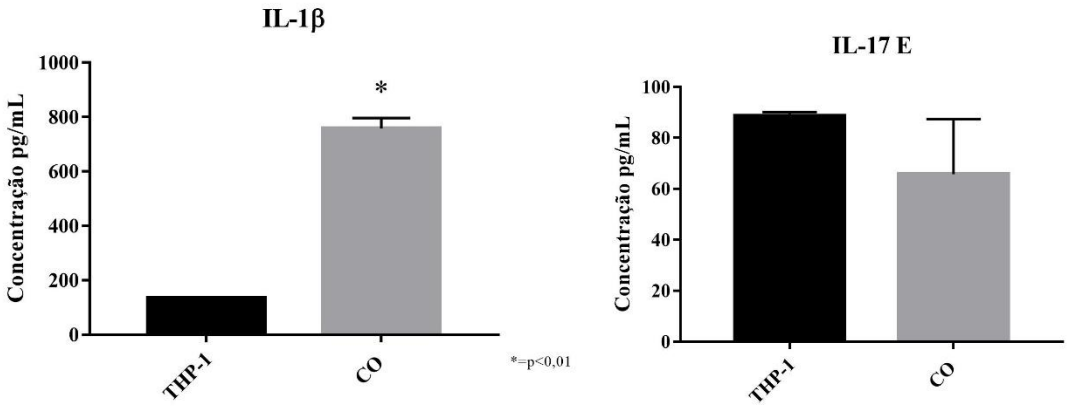


Figura 1 - Quantificação da liberação de IL-1β (A) e IL-17 E (B) no co-cultivo (CO)comparado ao controle THP-1 durante 24h

A IL-1β atua na amplificação da resposta pró-inflamatória durante a infecção por vários patógenos, afim de defender o hospedeiro (CHU *et al.*, 2016) e também é importante para tornar mais lento o desenvolvimento das hifas fungicas, protegendo os macrófagos (YOSHIKAWA, YAMADA; DE ALMEIDA, 2015).

Já a IL-17 E desempenha um papel de proteção nos tecidos de barreiras do hospedeiro, recrutando os neutrófilos, monócitos e macrófagos (CONTI;

GAFFEN, 2016). Sugerimos que não encontramos diferença entre as condições estudadas, pois essa citocina é chave para a homeostase imune e para a defesa do hospedeiro em tecidos superficiais (SPARBER *et al.*, 2018) e neste caso estamos simulando uma infecção sistêmica.

4. CONCLUSÕES

A maior liberação de IL-1 β durante o co-cultivo de macrófagos com *T. rubrum* mostrou a ativação do sistema imune. Através do uso do co-cultivo foi possível estabelecer um modelo de infecção sistêmica causada por *T .rubrum*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUORI, A. *et al.* Epidemiology of dermatophytic infections between 2008 and 2017 in Barcelona, Spain. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 7 maio 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X19301466>. Acesso em: 27 ago. 2019.

BOMFIM, L. G. S. *et al.* Leishmania infantum Induces the Release of sTREM-1 in Visceral Leishmaniasis. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 2265, 16 nov. 2017. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.02265/full>. Acesso em: 14 ago. 2018.

BONGOMIN, F. *et al. Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision*. *Journal of Fungi*. [S.l.]: MDPI AG. , 1 dez. 2017

CANTELLI, B. A. M. *et al.* Caffeic acid and licochalcone A interfere with the glyoxylate cycle of Trichophyton rubrum. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 96, p. 1389–1394, 2017.

CHU, J.-Q. *et al.* Production of IL-1β and Inflammasome with Up-Regulated Expressions of NOD-Like Receptor Related Genes in Toxoplasma gondii-Infected THP-1 Macrophages. *The Korean journal of parasitology*, v. 54, n. 6, p.

711–717, dez. 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28095655>. Acesso em: 16 ago. 2018.

CONTI, H. R.; GAFFEN, S. L. IL-17-mediated immunity to the opportunistic fungal pathogen Candida albicans. v. 195, n. 3, p. 780–788, 2016.

FACHIN, A. L. *et al.* Role of the ABC transporter TruMDR2 in terbinafine, 4-nitroquinoline N-oxide and ethidium bromide susceptibility in Trichophyton rubrum. *Journal of Medical Microbiology*, v. 55, n. 8, p. 1093–1099, 2006.

KHURANA, A.; SARDANA, K.; CHOWDHARY, A. Antifungal resistance in dermatophytes: Recent trends and therapeutic implications. *Fungal Genetics and Biology*, v. 132, p. 103255, 1 nov. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S108718451930177X>. Acesso em: 1 out. 2019.

LANTERNIER, F. *et al.* Deep Dermatophytosis and Inherited CARD9 Deficiency. 2013.

QUINTANS, J. S. S. *et al.* Monoterpenes modulating cytokines - A review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 123, n. October 2018, p. 233–257, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.10.058>.

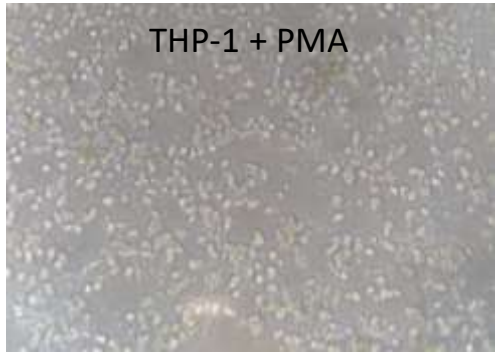
SPARBER, F. *et al.* Langerin+ DCs regulate innate IL-17 production in the oral mucosa during Candida albicans-mediated infection. *PLoS pathogens*, v. 14, n. 5, p. e1007069, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29782555>. Acesso em: 16 ago. 2018.

YOSHIKAWA, F. S. Y.; FERREIRA, L. G.; DE ALMEIDA, S. R. IL-1 signaling inhibits trichophyton rubrum conidia development and modulates the IL-17 response in vivo. *Virulence*, v. 6, n. 5, p. 449–457, 1 jan. 2015.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

Quantificação das interleucinas IL-1-β e IL-17E durante co-cultivo de de macrófago THP-1 com *Trichophyton rubrum* simulando uma infecção sistêmica

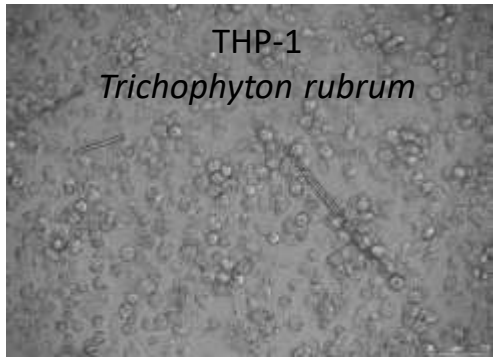
BRUNA ALINE MICHELOTTO CANTELLI; GABRIELA GONZALEZ SEGURA, TAMIRES APARECIDA BITENCOURT, MARIANA HEINZEN DE ABREU, ANA LÚCIA FACHIN.



Macrófagos



Conídios



Co-cultivo

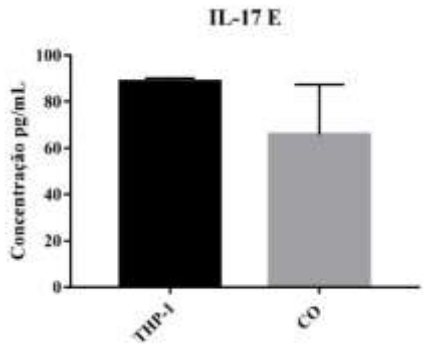


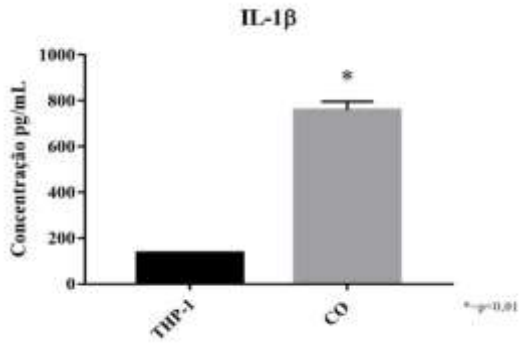
Quantificação citocinas



Leitura
450nm
620nm

Resultados





Kombuchá: um probiótico efetivo para saúde humana e o câncer

EMILLI KARINE MARCOMINI[1]

[1]*Enfermeira. Mestranda em Biotecnologia (UFPR-setor Palotina). Bolsista CAPES.*

1. INTRODUÇÃO

A prática de uma alimentação saudável atualmente demanda de produtos funcionais, aos quais proporcionam benefícios ao organismo e desempenham funcionalidades relevantes, que o inserem na lista de alimentos de grande interesse ao campo da saúde humana (SANTOS ET AL, 2019).

A *kombucha* é uma bebida fermentada elaborada, a partir de chá verde e açúcar de diversas fontes, acrescido de uma colônia simbiótica de bactérias destacando as *Acetobacter xylinum, Acetobacter xylinoides, Bacterium gluconicum, Acetobacter aceti, Acetobacter pasteurianus* e as leveduras *Schizosaccharomyces pombe, Saccharomycodes ludwigii, Kloeckera apiculata, Hanseniaspora guilliermondii, Saccharomyces cerevisiae, Zygosaccharomyces bailii, Torulaspora delbrueckii, Brettanomyces bruxellensis, Brettanomyces lambicus, Brettanomyces custersii e Candida stellate* (SANTOS;NÓBREGA, 2019).

A composição deste probiótico consiste em resíduos metabólitos, como ácido glucurônico (responsável pela desintoxicação das células), ácido hialurônico (responsável pela elasticidade natural de nossa pele), ácido acético, ácido láctico, ácido fólico, aminoácidos, ferro e vitaminas do complexo B (SANTOS;NÓBREGA, 2019).

O processo funcional da bebida se deve ao fato dos microrganismos consumirem o açúcar e a cafeína do chá, transformando-o em uma bebida naturalmente gaseificada repleta de vitaminas e enzimas, probióticos e ácidos orgânicos altamente benéficos à saúde (SANTOS;NÓBREGA, 2019).

2. OBJETIVO

Identificar na literatura científica a descrição dos benefícios do chá de K*ombucha* para a saúde humana, bem como sua atuação em células cancerígenas.

3. METODOLOGIA

A presente pesquisa trata-se de uma revisão sistemática da literatura, redigida no período de maio a julho de 2020, utilizando artigos disponíveis nas bases de dados Google Acadêmico, SciELO, BVS, LILACS e BDENF. Para a

busca, utilizou-se dos descritores disponíveis no Descritores em Ciências da Saúde (DeCS): Alimento Funcional; Chá de *Kombucha*; Probióticos; Saúde.

Como critério de inclusão, recuperaram-se os artigos publicados no período de 2016 a 2020, disponíveis gratuitamente para leitura na íntegra, na língua portuguesa, inglesa ou espanhola e que abordassem a correlação da *Kombucha* com a saúde humana. Como critérios de exclusão, foram eliminados estudos que não abordassem os assuntos *Kombucha* para saúde humana e artigos em duplicidade.

O processo de seleção foi dividido em três fases: a primeira referente à leitura dos títulos, a segunda relativa à leitura dos resumos escolhidos anteriormente e a terceira etapa realizado à leitura na íntegra dos artigos selecionados na segunda fase. Ao final, estudos selecionados foram explorados na íntegra para obtenção de dados para discussão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A busca nas bases de dados identificaram 133 publicações, a qual a partir dos critérios da pesquisa, apenas sete artigos foram selecionados para corresponder a amostra, pois se enquadravam nos objetivos e métodos do estudo.

A exclusão dos 126 artigos se justifica pelo fato de grande parte dos estudos não estar relacionada aos benefícios do probiótico a saúde humana, retratavam apenas a composição e técnicas de preparo, correspondiam a descrição de outro probiótico, bem como não estavam disponíveis gratuitamente para leitura.

A atuação deste probiótico está ligada diretamente ao equilíbrio gastrointestinal e consequentemente, ao melhoramento do sistema imunológico do indivíduo, especialmente por conter uma carga considerada de bifidobactérias (bactérias benéficas ao organismo), capazes de prevenir doenças como colesterol, diarreias e inclusive o câncer (BRUSCCHI; SOUSA; MODESTO, 2018; SANTOS; NÓBREGA, 2019).

Somado a isso, o chá da K*ombucha* é eficaz contra bactérias entéricas patogênicas, a exemplo da *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella* Typhi e *Vibrio cholera*, pois contém ácidos orgânicos, como os ácidos glucurônico, glucônico, DSL, ascórbico, acético e succínico (KAEWKOD; BOVONSOMBUT; TRAGOOLPUA, 2019).

É valido considerar que a microbiota do organismo humano desempenha papel relevante na saúde, prevenindo o organismo de infecções oportunas e malassezias, bem como auxiliando no tratamento da obesidade (BRUSCCHI; SOUSA; MODESTO, 2018). Contudo, bebidas funcionais podem fazer com que este processo se torne ainda mais eficiente e benéfico.

Em se tratando da atuação do probiótico em células cancerígenas, uma pesquisa revelou que o extrato de *Kombucha*, por afetar os principais genes na via da apoptose, reduz a quantidade de divisão celular, levando à inibição do

desenvolvimento do tecido canceroso, especialmente na concentração de 75% do extrato após 72 horas (SHABANI; BOSTANABAD; SALEHIPOUR, 2018).

Corroborando, no estudo de KIM ET AL (2016), as atividades biológicas da *Kombucha* inibiram significativamente o crescimento de células de câncer de bexiga, T-24 e 5637, demonstrando que o chá é uma bebida funcional e eficaz. Outro estudo observou que a K*ombucha* demonstrou toxicidade em células cancerosas colorretais Caco-2, indicando efeitos positivos contra o câncer (KAEWKOD; BOVONSOMBUT; TRAGOOLPUA, 2019).

A difusão das propriedades da *Kombucha* tem se expandido pelo mundo, destacando o efeito protetor para doenças cardiovasculares, hepáticas, metabólicas, artrite, constipação e câncer, além de atrair o interesse de mais pesquisadores da área da saúde humana (SANTOS ET AL, 2019). Desta forma, pode-se afirmar que o consumo de bebidas ricas em antioxidantes, protegem o corpo humano de radicais, retardando o progresso de muitas patologias (LOBO; DIAS; SHENOYE, 2017).

5. CONCLUSÕES

A presente pesquisa descreveu os benefícios do chá de K*ombucha*, destancando ser uma bebida funcional capaz de trazer efeito terapêutico considerável para doenças, assim como benefícios gerais para a saúde humana. A eficiência do probiótico sob céulas cancerígenas descrita na revisão por meio de ensaios clínicos, insere o chá como um probiótico relevante a ser considerado no campo da saúde humana, para prevenção e promoção da saúde, bem como para pesquisas clínicas e experimentais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRUSCHI, J.S.; SOUSA, R. C.S.; MODESTO, K.M.R. O Ressurgimento do Chá de Kombucha. **Rev Inic Cient Ext.,** n.1, v. esp., p. 162-108, 2018.

LOBO, R.O.; DIAS, F, SENHOY, C. K. Kombucha for healthy living: evaluation of antioxidant potential and bioactive compounds. **Internatonal Food Research Journal**, v.24, n.2, p.541-546, 2017.

KAEWKOD, T.; BOVONSOMBUT, S.; TRAGOOLPUA, Y. Eficácia do Kombuchá obtido dos chás verdes, Oolong e pretos na inibição de bactérias patogênicas, antioxidação e toxicidade na linha celular de câncer colorretal. **Microorganisms,** *v*.7, n.12, p.700, 2019.

KIM, C. ET AL. Inibição de crescimento e indução de apoptose em células de câncer de bexiga humana induzidas por fermentado de citrus kombuchá. **Jornal da**

Sociedade Coreana de Ciência Alimentar e Nutrição, v.45, ed. 10, p.1422-1429, 2016.

SANTOS, J.S.; NÓBREGA, G. S. KOMBUCHÁ: consumo, benefícios e comercialização. In: **22ª Semana de Mobilização Científica- SEMOC**, 1, 2019, **Anais da 22ª Semana de Mobilização Científica- SEMOC**. Salvador BA: Universidade Católica do Salvador, 2019.

SANTOS, Y, M. A. ET AL. Avaliação da composição de kombucha a base de diferentes chás (verde e preto). **Rev.Bras.de Gestão Ambiental**, v.12, n.03, p.01-06, 2019.

SHABANI, N.Z.; BOSTANABAD, Z.S.; SALEHIPOUR, M. Investigando a expressão do gene survivina na linha de células de câncer de próstata DU145 tratada com extrato de Kombucha. **NCMBJ**, v.8, n.32, p.107-114, 2018.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA
Pós Graduação
PPGB

Kombuchá: um probiótico efetivo para saúde humana e o câncer

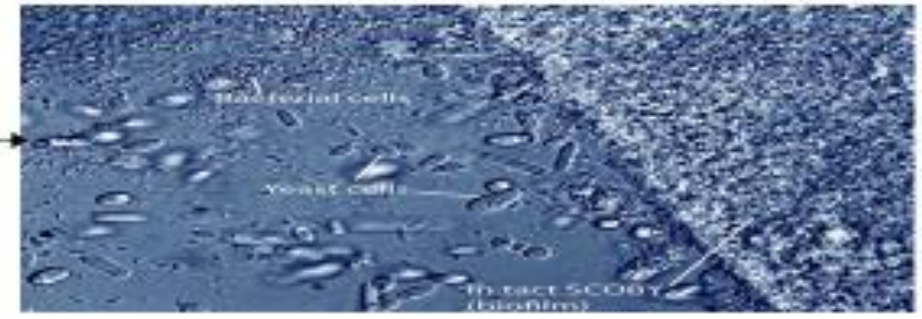
EMILLI KARINE MARCOMINI[1]

Bebida fermentada elaborada, a partir de chá verde e açúcar, acrescido de uma colônia simbiótica de leveduras e bactérias.



Leva à inibição do desenvolvimento do tecido canceroso;
Eficaz contra bactérias entéricas patogênicas;
Apresenta efeito terapêutico considerável para doenças em geral.





ALOE VERA E SUA POTENCIALIDADE COMO CICATRIZANTE

EMILLI KARINE MARCOMINI[1]

[1]*Enfermeira. Mestranda em Biotecnologia (UFPR-setor Palotina). Bolsista CAPES.*

1. INTRODUÇÃO

A *Aloe vera*, popularmente conhecida como babosa, é uma planta de origem africana, pertencente a família das Liliáceas, com potencial cicatrizante e antimicrobiano, sendo utilizada em cicatrização de lesões teciduais gerais (PINHEIRO, 2019; CAGNI, LUBI, 2018). O uso de plantas medicinais em feridas, aos quais incluem queimaduras, incisões cirúrgicas, pressão local por tempo prolongado e trauma, têm crescido nos últimos tempos, haja vista a ação eficaz na reparação tecidual (LIRA ET AL 2020).

De acordo com ANJOS ET AL (2020) a pele é um dos mais importantes órgãos do corpo humano, fazendo com que a temática de cicatrização envolvendo plantas medicinais, seja um evento de fundamental relevância clínica e científica.

2. OBJETIVO

Avaliar as publicações científicas mais atuais a respeito do *Aloe vera* e sua potencialidade como cicatrizante.

3. METODOLOGIA

A presente pesquisa trata-se de uma revisão bibliográfica, redigida no período de abril a agosto de 2020, utilizando artigos disponíveis nas bases de dados Google Acadêmico, SciELO, BVS, LILACS e BDENF. Para a busca, utilizou-se dos descritores disponíveis no Descritores em Ciências da Saúde (DeCS): *Aloe vera;* Cicatrização; Ferimentos e Lesões; Plantas Medicinais.

Como critério de inclusão, recuperaram-se os artigos publicados no período de 2016 a 2020, disponíveis gratuitamente para leitura na íntegra, estavam em língua portuguesa e que abordassem a aplicação da Aloe vera no reparo tecidual de humanos. Como critérios de exclusão, foram eliminados estudos que não abordassem os assuntos de cicatrização e/ou inflamação, artigos que abordavam a aplicação de *Aloe vera* em animais, artigos que descreviam apenas a morfologia da planta *Aloe vera* e artigos em duplicidade.

O processo de seleção foi dividido em três fases: a primeira referente à leitura dos títulos, a segunda relativa à leitura dos resumos escolhidos anteriormente e a terceira etapa realizado à leitura na íntegra dos artigos selecionados na segunda fase. Ao final, os artigos foram explorados na íntegra para extração dos dados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A busca nas bases de dados identificaram 237 publicações, a qual a partir dos critérios da pesquisa, apenas cinco artigos foram selecionados para corresponder a amostra, pois se enquadravam nos objetivos e métodos do estudo.

Destaca-se a exclusão de grande 232 estudos, visto que os mesmos descreviam outros efeitos farmacológicos não cicatrizantes da planta, propriedades fitoquímicas, atuação na área ambiental e agronômica, bem como não estavam disponíveis gratuitamente para leitura.

A cicatrização de um tecido humano é um processo complexo que envolve a ação de células e sinais químicos, com finalidade de reparar o tecido lesionado. As plantas medicinais são consideradas uma alternativa viável pois constituem uma terapêutica ágil e de baixo custo, sendo a escolha de uma parcela significativa da população (LIRA ET AL, 2020).

A composição das folhas da planta *Aloe vera* possuem dois fatores que contribuem para o processo de cicatrização: o primeiro refere-se a um líquido extraído das células do periciclo, de coloração amarelo-avermelhada, rico em compostos antracênicos e o segundo, um gel incolor (mucilagem) contendo aproximadamente 99,5% de água, utilizado na indústria como um potencializador para os efeitos da cicatrização (CAGNI; LUBI, 2018).

O gel obtido da folha da *Aloe vera* constitui-se basicamente de água, polissacarídeos, vitaminas A, B, C e E, cálcio, potássio, magnésio e zinco, onde destaca-se no parênquima da planta, um substrato cicatricial de grande interesse médico, a manose-6-fostato, estimulante proliferativo de fibroblastos, macrófagos, antraquinona e angiogênese (LIRA ET AL 2020).

Para comprovar e trazer cientificidade aos efeitos da *Aloe vera,* uma pesquisa experimental desenvolvida em Campina Grande (PB), revelou que o extrato in natura da babosa sob a cicatriz de ferida excisional de camundongos apresentou resultados satisfatórios com contração de bordas, quando comparado com o grupo controle, visto a ação antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, fibroblástica e angiogênica da planta, todos coadjuvantes no processo cicatricial (ANJOS ET AL, 2020).

Um outro estudo experimental realizado com 20 *Rattus Norvegicus, Wistar*, destacou que com aplicação da *Aloe vera* também houve maior contração, proliferação fibroblástica, intensa neovascularização e epitelização nas lesões do grupo tratado a partir do terceiro dia, concluindo que a planta possui ação ativa e eficaz no processo de cicatrização de lesões em modelo experimental (GOMES ET AL, 2016).

A pesquisa clínica de PINHEIRO (2019) enfatiza que o gel de *Aloe vera* é um medicamento fitoterápico que possui propriedades antinflamatórias e catalizadores, com potencial efeito para tratamento de lesão por pressão, visto que reduz aspectos da ferida e tempo de cicatrização, sendo também, economicamente mais viável.

A aplicação da planta *Aloe Vera* nas lesões teciduais é considerada positiva por sua ação anti-inflamatória, por fornecer o oxigênio necessário para uma maior vascularização, bem como por possibilitar uma multiplicação crescente de células epiteliais. Ao estimular o processo de cicatrização, ocorre

a elevação da produção de anticorpos e consequentemente a varredura de radicais livres produzidos por neutrófilos, somado a isso, as propriedades antinflamatórias estimulam o crescimento de fibroblastos (CAGNI, LUBI, 2018).

LIRA ET AL (2020) afirma que o uso da *Aloe vera* traz benefícios positivos ao processo de cicatrização, principalmente pela velocidade de cicatrização e pela evolução das lesões. Corroborando, GOMES ET AL (2016) aponta que a utilização de *Aloe vera* influencia na contração da ferida devido aos efeitos de estimulação da infiltração de células inflamatórias, da proliferação de fibroblastos e angiogênese, além da elevação da síntese de colágeno.

5. CONCLUSÕES

A cicatrização de uma lesão tecidual é processo complexo a qual envolve demanda de atividade celular e mediadores químicos para ativação de respostas vasculares, levando a possível regeneração do tecido. A planta medicinal *Aloe vera*, tem se tornado cada vez mais viável para o processo de cicatrização, principalmente devido aos estudos clínicos comprovarem sua efetividade e também por seus baixos custos gerais, trazendo a terapia alternativa como forma de promoção e recuperação da saúde humana.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANJOS, C.J.F. et al. Avaliação cicatrizante de plantas medicinais frente lesões dérmicas em modelo murino: uma análise comparativa. **Research, Society and Development**, v. 9, n.8, e214984967, 2020.

CAGNI, T.F.; LUBI, N. *Aloe vera* no reparo tecidual**. Revista Eletrônica Biociências, Biotecnologia e Saúde**, Curitiba, v.11, n.20, p.33-42, maio-ago. 2018.

LIRA, H.S.L. et al. Efeitos do uso de *Aloe vera* na cicatrização de feridas. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v.1, n.53, e3571, p.1-11, 2020.

GOMES, J.C. et al. O efeito cicatrizante do *Aloe vera* em lesões cutâneas por segunda intenção. **Revista Brasileira de Iniciação Científica**, Itapetininga, v. 3, n. 5, 2016.

PINHEIRO, J.D. **Estudo clínico simples cego da ação cicatrizante da A*loe vera* como cobertura em lesões por pressão.** 2019. 45 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciências da Saúde) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Tocantins, Palmas-TO. 2019.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA
Pós Graduação
PPGB

ALOE VERA E SUA POTENCIALIDADE COMO CICATRIZANTE

EMILLI KARINE MARCOMINI[1]

Objetivo: Avaliar as publicações científicas mais atuais a respeito do *Aloe vera* e sua potencialidade como cicatrizante.

- Revisão bibliográfica;
- Artigos publicados no período de 2016 a 2020;
- Língua portuguesa;
- Abordagem: aplicação da Aloe vera no reparo tecidual de humanos.



AÇÃO CICATRIZANTE

- Estimulante proliferativo de fibroblastos, macrófagos, antraquinona e angiogênese;
- Contração de bordas;
- Antioxidante;
- Antimicrobiana;
- Anti-inflamatória;
- Vascularização tecidual.

INOSINA PREVINE DÉFICITS NA CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA E ALTERAÇÕES NA ATIVIDADE DA NA^+K^+ATPASE EM RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO ANIMAL DE AMNÉSIA INDUZIDO POR ESCOPOLAMINA

FERNANDA CARDOSO TEIXEIRA[1]; MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES[2]; CARLUS AUGUSTU COUTO[2]; JULIANE DE SOUZA CARDOSO[2]; ROSELIA MARIA SPANEVELLO[3]

[1] Universidade Federal de Pelotas– fe.t@hotmail.com
[2] Universidade Federal de Pelotas – mspereirasoares@gmail.com
[2] Universidade Federal de Pelotas – carlusatc@gmail.com
[2] Universidade Federal de Pelotas – ju.souza591@gmail.com
[3] Universidade Federal de Pelotas – rspanevello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O processamento da memória envolve os estágios de aquisição, consolidação e evocação (SQUIRE et al., 2015). A doença de Alzheimer (DA) é um distúrbio neurodegenerativo relacionado à perda progressiva de memória com déficits observados no estágio da consolidação (JAHN et al., 2013). A DA é reconhecida como uma prioridade global de saúde pública e ainda que não existem terapias curativas para esta doença (LANE et al., 2018).

Um dos mecanismos que tem sido associado aos déficits de memória em modelos de DA tem sido relacionado a alterações na atividade da enzima Na^+,K^+,ATPase. Esta enzima de membrana é responsável por gerar potenciais de ação e estabelecer os gradientes de concentração de Na^+ e K^+, que são essenciais para a homeostase dos íons no meio intracelular (ZHANG et al., 2013).

Os fármacos usados atualmente no tratamento da DA além de apresentarem efeitos colaterais indesejáveis limitam-se apenas a estabilização ou uma melhora temporária do paciente. Desta forma, é relevante a busca de novos agentes que possam interagir de forma mais específica com componentes fisiopatológicos dessa doença, contribuindo assim para o desenvolvimento de terapêuticas mais eficazes (KUMAR et al., 2018).

A inosina, um nucleosídeo formado pela desaminação da adenosina, têm apresentado importantes propriedades terapêuticas em modelos de doenças neurodegenerativas como Parkinson (CIPRIANI et al., 2014) e Esclerose Múltipla (VICENZI et al., 2013). Desta forma, em uma perspectiva nova e promissora este estudo teve como objetivo investigar os efeitos do tratamento com essa purina em modelo de amnésia na consolidação da memória induzida por escopolamina, bem como na atividade da enzima Na^+,K^+,ATPase em hipocampo e córtex cerebral de ratos.

2. METODOLOGIA

Pré-tratamento com inosina e protocolo de consolidação de memória:

Os ratos machos Wistar adultos (n=40), foram divididos em quatro grupos: Controle (C), escopolamina (SCO), escopolamina mais inosina 50 mg/kg (SCO + INO 50 mg / kg) e escopolamina mais inosina 100 mg/Kg (SCO + INO 100 mg/kg). O pré tratamento com inosina ocorreu durante 7 dias, uma vez ao dia, por via intraperitoneal (i.p). No 8º dia os animais foram treinados na esquiva inibitória, e 1 hora após receberam SCO (1mg/kg) dissolvida em solução salina por via i.p. A sessão de teste ocorreu 24 horas após o treinamento (CEEA 4808/2017).

Teste comportamental de esquiva inibitória: Os animais foram submetidos a uma única sessão de treino. Cada rato foi colocado na plataforma do aparato, sendo que quando este desceu com as quatro patas na grade, uma estimulação elétrica de 3s 0,5 mA foi aplicada à grade. Vinte e quatro horas após o treinamento, os animais foram submetidos ao teste, sendo cronometrado o tempo que o animal levou para descer da plataforma (latência). Um tempo de corte de 300 s foi estabelecido. Após o teste, os animais foram submetidos à eutanásia e o córtex cerebral e hipocampo foram coletados.

Atividade da enzima Na^+,K^+,ATPase: A atividade da Na^+,K^+,ATPase em córtex cerebral e hipocampo foi realizada de acordo com o método de CARVALHO et al.(2015) com modificações. A reação foi iniciada pela adição do substrato ATP a uma concentração final de 3 mM. Após 30 minutos a 37°C, a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de 10% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA). A leitura da absorbância foi realizada em 630 nm. A atividade específica de Na^+,K^+,ATPase foi expressa em nmol de Pi/mg de proteína/min.

Análise estatística: Os resultados da esquiva inibitória foram analisados pelo teste de Kruskal Walis. Os resultados Na^+,K^+,ATPase foram analisados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste post hoc de Tukey. A diferença estatística foi considerada com $P \leq 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontrados no teste comportamental da esquiva inibitória demostraram que a SCO causou redução na latência (s) quando comparada ao controle, indicando assim que a SCO causou um déficit na consolidação da memória destes animais. Por outro lado, o tratamento com inosina em ambas as doses (50 mg/kg e 100 mg/kg) foi capaz de prevenir estas alterações.

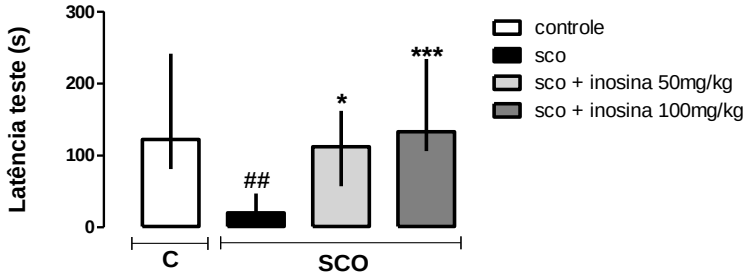


Figura1. Efeito do pré-tratamento com inosina (50 ou 100 mg/kg, i.p.) no comprometimento da memória induzida pela escopolamina (1 mg/kg) no protocolo de consolidação. Os dados representam a latência (em segundos (s)) dos animais na tarefa de esquiva inibitória em que A) representa o treino e o B) representa o teste da consolidação. ## P=0.0009 representa uma diferença significativa em comparação com o grupo controle (C). * P <0,05 e *** P <0,001 representa uma diferença significativa em comparação com o grupo de escopolamina (SCO).

Nossos dados também demonstraram que a atividade da Na^+,K^+- ATPase está reduzida no grupo SCO (P <0,01) em hipocampo, o que corrobora com os resultados encontrados na literatura (PINZ et al., 2020). Somente a inosina na dose de 100 mg/kg foi capaz de proteger as alterações dessa enzima induzidas pela SCO no hipocampo. Não foram observadas alterações significativas no córtex cerebral em nenhum dos grupos avaliados.

A inosina em ambas as doses (50 e 100 mg/kg) foi capaz de prevenir os déficits na consolidação da memória induzidos pela SCO. Esses dados estão de acordo com outro estudo do nosso grupo de pesquisa onde também foi observado que a inosina foi capaz de melhorar a memória em modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer (TEIXEIRA et al., 2020). Considerando que alterações na atividade enzimática da Na^+,K^+- ATPase estão associadas a déficits de memória, nosso resultados sugerem que um dos mecanismos de ação da inosina em melhorar a memória pode estar associado a capacidade de modular esta enzima, especialmente no hipocampo, uma importante região cerebral envolvida no processamento da memória

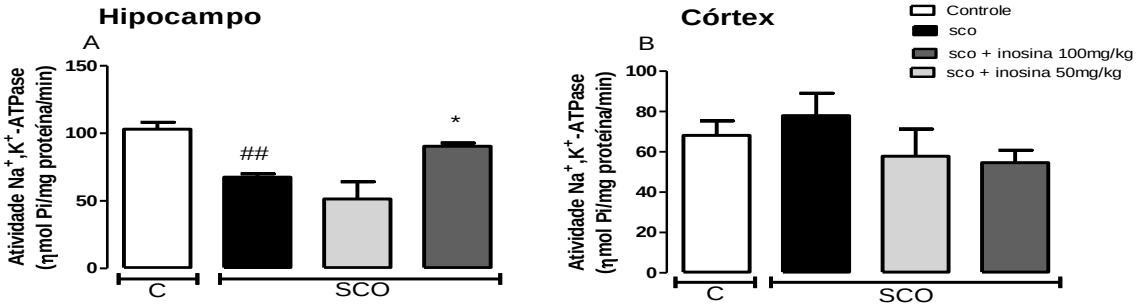


Figura2. Efeito do tratamento com inosina i.p. (50 e 100 mg/kg) durante 7 dias, na atividade enzimática da $Na,^+K,^+$ ATPase no hipocampo e no córtex cerebral (A e B) de ratos adultos no protocolo da consolidação da memória. As barras representam a média ± SEM. ## P <0,01 representa uma diferença significativa em comparação com o grupo controle (C). * P <0,05 representa uma diferença significativa em comparação com o grupo Escopolamina (SCO).

4. CONCLUSÕES

A inosina demonstrou efeitos promissores na fase de consolidação de memória bem como foi capaz de restaurar a atividade da enzima Na^+,K^+- ATPase no hipocampo, sugerindo assim que este nucleosídeo pode ter um potencial terapêutico contra déficits de memória e dano tecidual em patologias neurodegenerativas como a DA.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, F. B., et al. Anthocyanins suppress the secretion of proinflammatory mediators and oxidative stress, and restore ion pump activities in demyelination. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. 26(4):378-90. 2015.

CIPRIANI, S., BAKSHI, R., SCHWARZSCHILD, M. Protection by inosine in a cellular model of Parkinson's disease. **Neuroscience**. 22;274:242-9. 2014.

JAHN, H. Memory loss in Alzheimer's disease. **Dialogues in clinical neuroscience,** 15(4), 445. 2013.

KUMAR, K., et al. Recent advances in the neurobiology and neuropharmacology of Alzheimer's disease. **Biomedicine & pharmacotherapy,** v. 98, p. 297-307, 2018.

LANE, C. A., et al. Alzheimer's disease. **European Journal of Neurology**. v. 25.p:59-70, 2018.

PINZ, A. G., et al. Amnesia-ameliorative effect of a quinoline derivative through regulation of oxidative/cholinergic systems and Na+/K+-ATPase activity in mice**. Metabolic Brain Disease,** 1-12. 2020.

SQUIRE, L. R., et al. Memory consolidation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology,** 7(8), a021766. 2015.

TEIXEIRA, F. C., et al. Inosine protects against impairment of memory induced by experimental model of Alzheimer disease: a nucleoside with multitarget brain actions. **Psychopharmacology,** 237(3), 811-823. 2020.

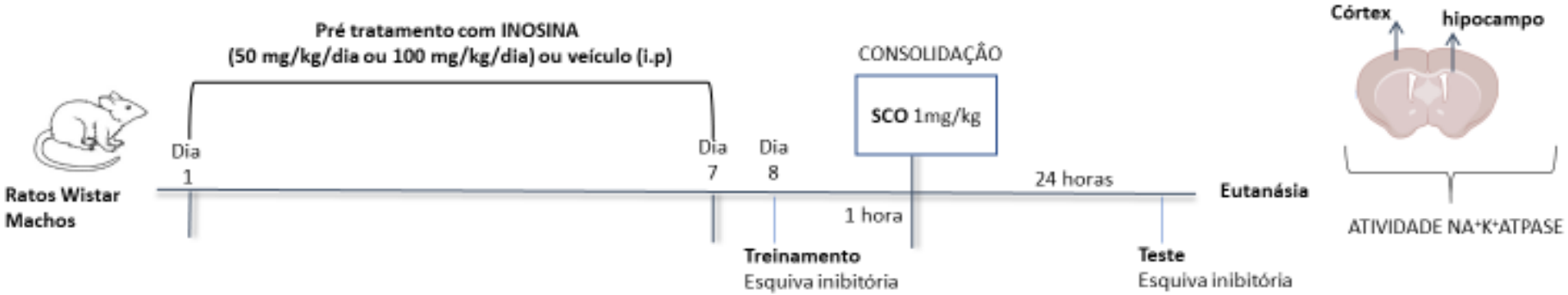
VINCENZI, F., et al. Multiple sclerosis lymphocytes upregulate A2A adenosine receptors that are antiinflammatory when stimulated**. European Journal of Immunology.** 43(8):2206-16. 2013.

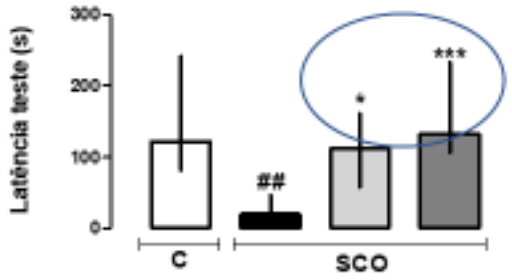
ZHANG, L., et al. Na+-K+-ATPase, a potent neuroprotective modulator against Alzheimer disease. **Fundamental Clinical Pharmacoly.** 27(1):96-103. 2013.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

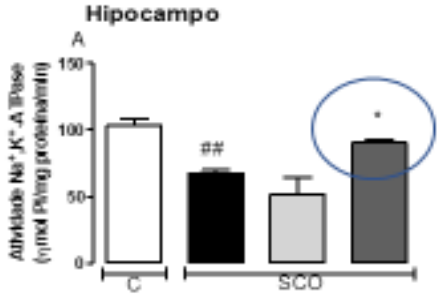
INOSINA PREVINE DÉFICITS NA CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA E ALTERAÇÕES NA ATIVIDADE DA NA⁺K⁺ATPASE EM HIPOCAMPO DE RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO ANIMAL DE AMNÉSIA INDUZIDO POR ESCOPOLAMINA

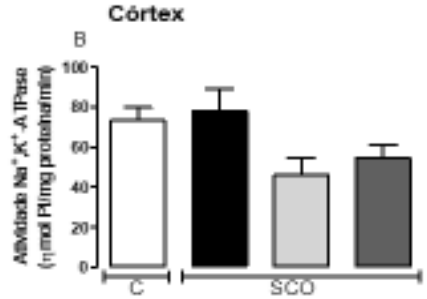
Fernanda Cardoso Teixeira[1]; Mayara Soares[2]; Carlus Augustu Couto[2]; Juliane Cardoso[2]; Roselia Maria Spanevello[3]





Efeito do pré-tratamento com inosina no comprometimento da memória (amnésia) induzida pela escopolamina na Esquiva inibitória.





Efeito do pré-tratamento com inosina na atividade da NA⁺K⁺ATPASE em hipocampo e cortex no comprometimento da memória (amnésia) induzida pela escopolamina.



INOSINA ↑ Latência teste esquiva inibitória = melhora memória

possivel mecanismo

↑ Atividade NA⁺K⁺ATPASE no hipocampo

REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE MARCADOR INFLAMATÓRIO TNF-α E MODULAÇÃO DA ENZIMA Na^+, K^+-ATPase COMO MECANISMOS ANTIDEPRESSIVOS DO ÁCIDO TÂNICO

Karina Pereira Luduvico; Mayara Sandrielly Pereira Soares; Juliane Torchelsen Saraiva; Francieli da Silva dos Santos; Juliane de Souza Cardoso; Francieli Moro Stefanello.

1. INTRODUÇÃO

A Depressão Maior (DM) é uma doença de alta incidência mundial e que contribui negativamente com a vida dos pacientes acometidos. Diversos estudos relacionam mecanismos inflamatórios com a fisiopatologia da DM, inclusive com dados de indivíduos depressivos que apresentam elevação em biomarcadores inflamatórios no soro, dentre eles o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) (Krishnadas & Cavanagh, 2014).

A bomba de sódio-potássio (Na^+, K^+-ATPase) é responsável pelo transporte ativo desses íons no sistema nervoso central (SNC). A literatura demonstra que a ação dessa enzima é fundamental para a integridade e homeostase celular, além do transporte de neurotransmissores (Kinoshita et al., 2016). Adicionalmente, alterações na atividade da Na^+, K^+-ATPase foram observadas em modelos animais de depressão, sugerindo a contribuição dessa enzima na fisiopatologia dessa doença (Gamaro et al., 2003; Goldstein et al., 2006; De Oliveira et al., 2019).

A administração periférica de lipopolissacarídeo (LPS) é capaz de estimular o sistema imune através dos receptores do tipo Toll, como o TLR-4, e aumentar a liberação de mediadores inflamatórios. É um modelo bem estabelecido para o estudo de comportamento tipo-depressivo e investigação de compostos (O'Connor et al., 2009; Zhu et al., 2016).

O ácido tânico (AT) é um polifenol do grupo dos taninos com grande capacidade quelante e antioxidante (Lopes et al., 1999). Possui atividade neuroprotetora relatada frente a modelo animal de doença de Alzheimer e de glioblastoma multiforme (Gerzson et al., 2020; Bona et al., 2020).

Neste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do pré-tratamento com AT sobre a atividade da Na^+, K^+-ATPase e níveis de TNF-α no córtex cerebral e hipocampo de animais submetidos ao modelo de comportamento tipo-depressivo induzido por LPS.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Protocolo experimental

Foram utilizados camundongos Swiss machos divididos nos grupos: I – Controle (Salina); II – Salina + LPS; III – AT (30 mg/kg) + LPS; IV – AT (60 mg/kg) + LPS; V – Fluoxetina (20 mg/kg) + LPS. Os animais foram fornecidos e mantidos no Biotério Central da UFPel tiveram livre acesso à água e comida. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel (CEEA n° 32979-2019). O pré-tratamento foi realizado durante 7 dias por via oral, e no sétimo dia foi realizada a injeção com o LPS (830 µg/kg) pela

via intraperitoneal. 24 horas após, os animais foram submetidos a eutanásia para obtenção do córtex cerebral e hipocampo utilizados nas análises posteriores.

2.2 Avaliação dos níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF-α)

Para essa técnica, as estruturas cerebrais foram homogenizadas em tampão fosfato-salina (PBS), centrifugados em condições adequadas e o sobrenadante foi obtido. A quantificação de TNF-α foi realizada através do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) adquirido da BD Biosciences Laboratory. Os resultados foram expressos como pg/mg de proteína.

2.3 Atividade da bomba de sódio-potássio (Na^+, K^+-ATPase)

Primeiramente, as estruturas cerebrais foram homogenizadas em tampão Tris-HCl livre de fosfato, centrifugadas em condições adequadas e o sobrenadante foi coletado. A atividade foi expressa como nmol Pi liberado/min/mg de proteína (Wyse et al., 2007).

2.4 Análises estatísticas

Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido do teste post hoc de Tukey utilizando o software GraphPad Prism 5. Os resultados foram expressos como média ± erro médio padrão e considerados significativos quando $P<0,05$.

3. RESULTADOS

Na Figura 1A, é possível observar que a administração de LPS foi capaz de aumentar os níveis de TNF-α no córtex cerebral em comparação com o grupo controle *(P<0,01)*. O pré-tratamento com fluoxetina (controle positivo) e AT na dose de 60 mg/kg foram capazes de diminuir os níveis desse marcador inflamatório comparado ao grupo LPS *(P<0,01)*. Os níveis de TNF-α (Figura 1B) aumentaram no hipocampo devido a administração de LPS *(P<0,01)*. Entretanto, a fluoxetina demonstrou um efeito preventivo comparado ao grupo LPS *(P<0,05).* O pré-tratamento com AT não foi capaz de reduzir os níveis de TNF-α nessa estrutura cerebral.

A Figura 2A demonstra uma diminuição da atividade da Na^+, K^+-ATPase no córtex cerebral frente a administração de LPS comparado ao grupo controle *(P<0,001)*. Entretanto, a fluoxetina (*P<0,05)* e o AT na maior dose (*P<0,001)* foram capazes de prevenir essa alteração. Também houve uma redução significativa na atividade da Na^+, K^+-ATPase (Figura 2B) no hipocampo comparado ao grupo controle *(P<0,001)*. Contudo, o AT na dose de 30 mg/kg (*P<0,05)* e na dose de 60 mg/kg *(P<0,001)* foram capazes de aumentar a atividade dessa enzima comparado ao grupo LPS.

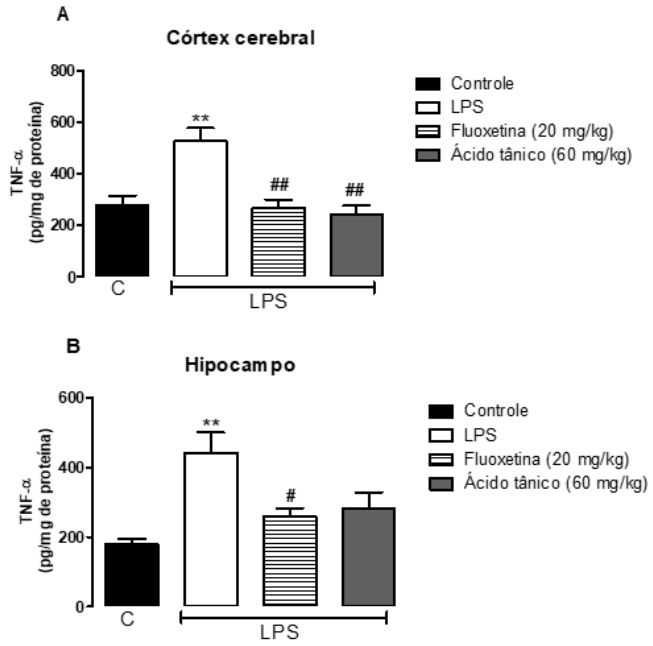


Figura 1: Efeito do tratamento com ácido tânico e fluoxetina sobre os níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) em córtex cerebral (A) e hipocampo (B) de animais submetidos ao modelo de depressão induzido por lipopolissacarídeo (LPS). Os dados estão expressos como média ± erro médio padrão (n = 4-5 animais por grupo). (**) *P<0,01* comparado ao grupo controle; (##) *P<0,01;* (#) *P<0,05* comparado ao grupo LPS.

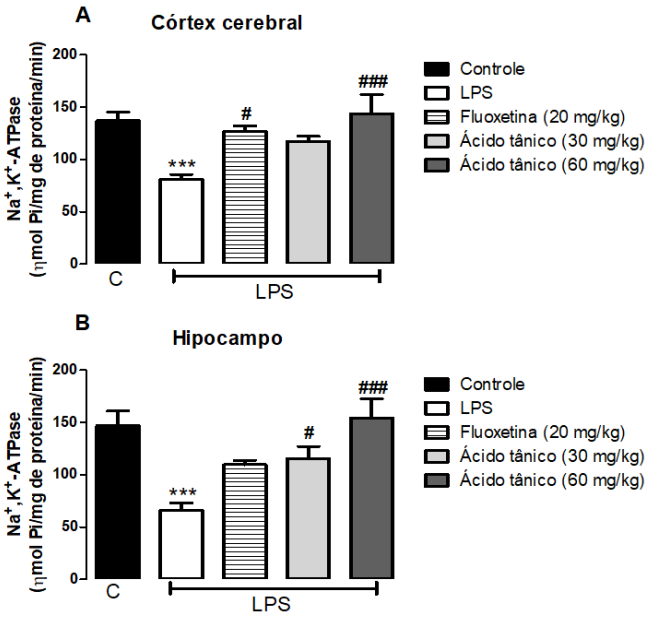


Figura 2: Efeito do tratamento com ácido tânico e fluoxetina sobre a atividade da Na^+, K^+-ATPase em córtex cerebral (A) e hipocampo (B) de animais submetidos ao modelo de depressão induzido por lipopolissacarídeo (LPS). Os dados estão expressos como média ± erro médio padrão (n = 5-8 animais por grupo). (***) *P<0,001* comparado ao grupo controle; (#) *P<0,05*; (###) *P<0,001* comparado ao grupo LPS.

4. DISCUSSÃO

Em diferentes tipos celulares, como macrófagos e microglia, citocinas como o TNF-α podem estimular a produção de espécies reativas de oxigênio e contribuir para a ativação do fator nuclear kappa B (NF-κB), estimulando assim

uma maior liberação de moléculas pró-inflamatórias (Krishnadas & Cavanagh, 2014). Sendo assim, é de grande interesse compostos que possuam atividade anti-inflamatória para o manejo terapêutico do transtorno depressivo. Em relação a Na^+, K^+-ATPase, trata-se de uma importante bomba iônica que necessita estar em pleno funcionamento para a homeostase do SNC. Nossos resultados estão de acordo com outros trabalhos, os quais também relatam diminuição na atividade da Na^+, K^+-ATPase em modelos animais de depressão (Gamaro et al., 2003; Goldstein et al., 2006).

5. CONCLUSÕES

Podemos observar a ação do AT na modulação de uma importante bomba iônica e na redução dos níveis de TNF-α, mecanismos envolvidos na fisiopatologia da DM. No entanto, mais estudos precisam ser realizados para melhor compreender os efeitos do AT em outros parâmetros neuroquímicos.

6. REFERÊNCIAS

Bona et al. (2020) Tannic acid elicits selective antitumoral activity in vitro and inhibits cancer cell growth in a preclinical model of glioblastoma multiforme. Metab Brain Dis 35:283-293.

De Oliveira et al. (2019) Contribution of serotonergic and nitrergic pathways, as well as monoamine oxidase-a and Na^+, K^+ -ATPase enzymes in antidepressant-like action of ((4-tert-butylcyclohexylidene) methyl) (4-methoxystyryl) sulfide (BMMS). Metab Brain Dis 5:1313-1324.

Gamaro et al. (2003) Reduction of hippocampal Na^+ , K^+ -ATPase activity in rats subjected to an experimental model of depression. Neurochem Res 28:1339-1344 .

Gerzson et al. (2020) Tannic acid ameliorates STZ-Induced Alzheimer's Disease-like impairment of memory, neuroinfammation, neuronal death and modulates akt expression. Neurotox Res 37:1009-1017.

Goldstein et al. (2006) Involvement of Na^+, K^+ -ATPase and endogenous digitalis-like compounds in depressive disorders. Biol Psychiatry 60:491-499.

Kinoshita et al. (2016) The Influence of Na^+, K^+-ATPase on Glutamate Signaling in Neurodegenerative Diseases and Senescence. Front Physiol 7:195.

Krishnadas R, Cavanagh J (2014) Depression: an inflammatory illness? J Neurol Neurosurg Psychiatry 83:495-502.

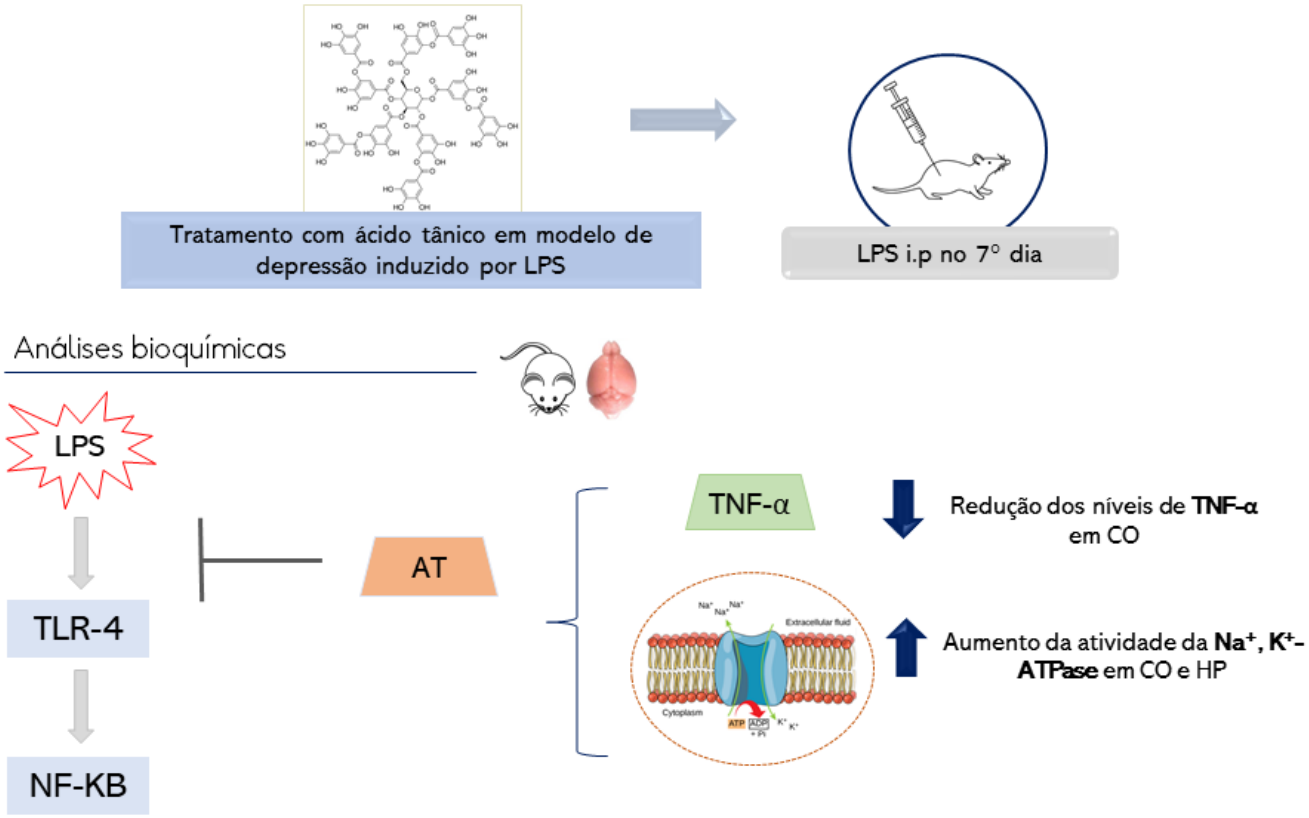
Lopes et al. (1999) Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ion. Biochim Biophys Acta 1472:142-152.

O'Connor et al. (2009) Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. Mol Psychiatry 14:511-522.

Wyse et al. (2007) Methylmalonate administration decreases Na^+,K^+-ATPase activity in cerebral cortex of rats. Neuroreport 11:2331-2334.

Zhu et al. (2016) Esculetin attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammatory processes and depressive-like behavior in mice. Physiol Behav 163:184-192.

Graphical Abstract



EXTRATO DE MIRTILO PREVINE COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO E ATENUA O ESTRESSE OXIDATIVO EM CÓRTEX CEREBRAL INDUZIDO PELO LIPOPOLISSACARÍDEO EM CAMUNDONGOS

LUIZA SPOHR[1]; KARINA PEREIRA LUDUVICO[2]; NATÁLIA PONTES BONA[2]; MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES[1]; FRANCIELI STEFANELLO[2]; ROSELIA SPANEVELLO[1,3]

[1] *Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer, UFPel – luizaspohr@hotmail.com*
[2] *Laboratório de Biomarcadores, UFPel – karina_luduvico@outlook.com*
[2] *Laboratório de Biomarcadores, UFPel – natinhabona@hotmail.com*
[1] *Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer, UFPel – mspsoares@gmail.com*
[2] *Laboratório de Biomarcadores, UFPel – fmstefanello@gmail.com*
[1,3] *Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer, UFPel – rspanevello@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

O transtorno depressivo maior (TDM) é uma doença psiquiátrica crônica e altamente incapacitante, caracterizada por sintomas como humor deprimido, anedonia, alterações em funções neurovegetativas e ideação suicida (MALHI; MANN, 2018). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (2017), essa doença acomete aproximadamente 5,8% da população brasileira e em torno de 300 milhões de pessoas no mundo.

O tratamento dessa patologia consiste em uso de fármacos associado com a psicoterapia. Existe uma ampla variedade de medicamentos antidepressivos disponíveis, os quais comumente atuam na neurotransmissão monoaminérgica, como a fluoxetina. No entanto, o uso desses fármacos está atrelado à baixa eficácia, custo variado e a incidência de efeitos adversos (HUANG et al. 2017).

A fisiopatologia da depressão é multifatorial, no entanto, a mesma é considerada pouco elucidada. Dentre os mecanismos descritos na literatura, destaca-se a hipótese do estresse oxidativo, o qual se caracteriza por um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes do organismo. Tem sido consistentemente demonstrado um aumento do dano oxidativo e alterações na atividade de enzimas antioxidantes em pacientes com TDM (MAES et al. 2011).

Considerando o exposto, o desenvolvimento de estudos visando o esclarecimento da neurobiologia e a busca por alternativas terapêuticas se torna essencial. Nesse contexto, destaca-se o mirtilo (*Vaccinium* spp.). Esse fruto apresenta uma composição rica em polifenois, como as antocianinas, as quais são bem conhecidas pela sua ação antioxidante (LUYAO, 2018). Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial do extrato de mirtilo frente ao comportamento tipo-depressivo e alterações bioquímicas em córtex cerebral de camundongos submetidos ao lipopolissacarídeo (LPS).

2. METODOLOGIA

2.1. Modelo de depressão e protocolo de prevenção com extrato de mirtilo

Camundongos *Swiss* adultos foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas e mantidos em condições experimentais

controladas (CEEA nº 32979-2019). Os animais foram divididos em cinco grupos: I (controle), II (LPS 0,83 mg/kg), III (LPS + fluoxetina 20 mg/kg), IV (LPS + extrato de mirtilo 100 mg/kg) e V (LPS + extrato de mirtilo 200 mg/kg). Durante sete dias os animais receberam veículo, fluoxetina ou extrato de mirtilo por via oral. No 7° dia, também receberam salina ou LPS via intraperitoneal e após 24 horas o comportamento tipo-depressivo foi avaliado no teste de suspensão da cauda (STERU et al. 1985). Em seguida os animais foram submetidos à eutanásia, onde foi coletado o córtex cerebral. Posteriormente, foram mensurados os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) (ALI et al. 1992), níveis de nitrito (STUEHR; NATHAN, 1989) e a atividade da enzima catalase (CAT) (AEBI, 1984) nesta estrutura cerebral.

2.2. Análise estatística dos dados

Os resultados obtidos foram avaliados através de ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando $P<0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de suspensão da cauda é amplamente utilizado para avaliar o comportamento tipo-depressivo, bem como na prospecção de novos fármacos antidepressivos. Pode-se verificar na figura 1 que a administração de LPS resultou em aumento no tempo de imobilidade dos animais quando comparado ao grupo controle ($P<0,001$), enquanto que a fluoxetina e ambas as doses de extrato de mirtilo atenuaram essa alteração induzida pelo LPS ($P<0,01$).

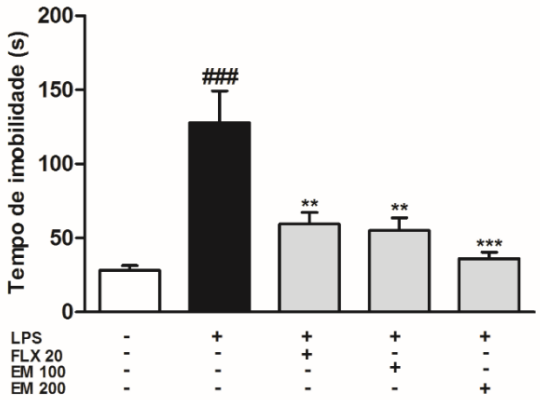


Figura 1 – Efeito do pré-tratamento com extrato de mirtilo (EM) ou fluoxetina (FLX) no tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda em um modelo animal de comportamento tipo-depressivo induzido por LPS. (###) Denota $P<0,001$ comparado com o grupo controle. (**) $P<0,01$ e (***) $P<0,001$ comparado com o grupo LPS.

Na figura 2 estão demonstrados os resultados obtidos quanto aos parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral. Pode-se observar que a administração de LPS causou um aumento nos níveis de ERO e de nitrito quando comparado ao grupo controle ($P<0,01$). No entanto, essa alteração foi atenuada pela administração de fluoxetina e extrato de mirtilo ($P<0,05$). Quanto à CAT, pode-se verificar que o extrato de mirtilo (200 mg/kg) foi capaz de atenuar a redução da atividade dessa enzima induzida pelo LPS ($P<0,01$).

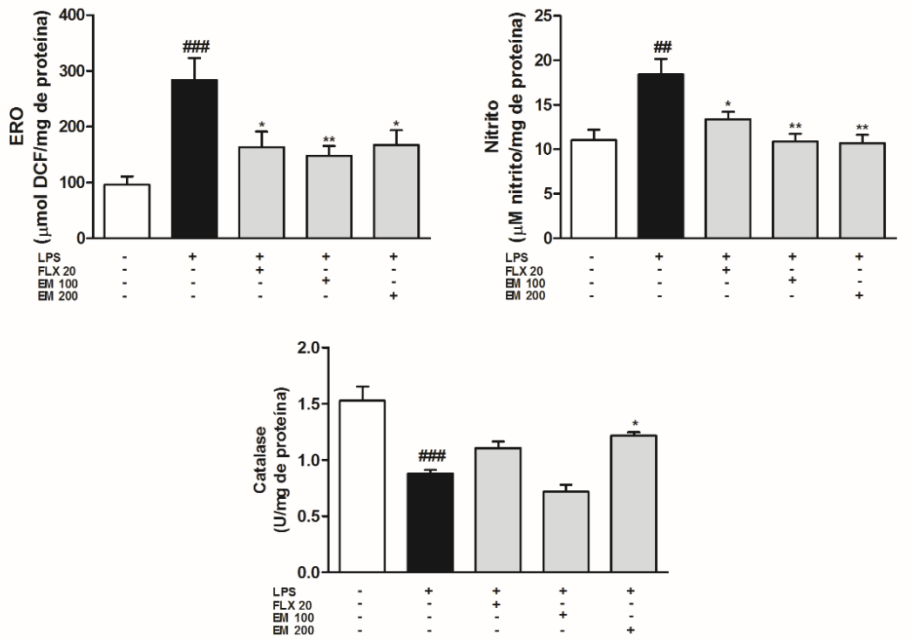


Figura 2 – Efeito do pré-tratamento com extrato de mirtilo (EM) ou fluoxetina (FLX) nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), nitrito e na atividade da enzima catalase em hipocampo de camundongos submetidos ao modelo animal de comportamento tipo-depressivo induzido por LPS. ($^{##}$) Denota *P*<0,01 e ($^{###}$) *P*<0,001 comparado com o grupo controle. (*) *P*<0,05 e (**) *P*<0,01 comparado com o grupo LPS.

O córtex cerebral está intrinsicamente relacionado com a depressão, uma vez que já foi demonstrado que pacientes com TDM apresentam reduções volumétricas nessa região (BELLEAU et al. 2019).

Quanto ao aumento na produção de EROs, esse pode ser decorrente da ativação do receptor *toll-like* 4 (TLR4) pelo LPS, o qual interage com a NADPH oxidase, uma das principais fontes de espécies reativas (PARK et al. 2004). Os níveis elevados de nitrito podem ser explicados pelo fato de que o LPS é capaz de aumentar a expressão da iNOS, enzima que participa da formação de óxido nítrico, o qual é oxidado rapidamente a nitrito (JIANG et al. 2017). A CAT é responsável por catalisar a decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Podemos inferir que uma redução na atividade dessa enzima possa estar acarretando em um acúmulo de H_2O_2, o qual pode também estar refletindo no aumento exacerbado da produção de EROs (CHELIKANI et al. 2004).

O extrato de mirtilo se mostrou como um potente agente neuroprotetor, atenuando as alterações induzidas pelo LPS. Essa capacidade do mirtilo pode estar relacionada com as antocianinas presentes em sua composição, uma vez que as mesmas são capazes de atuar na eliminação de radicais livres, quelar metais e reduzir a expressão do TLR4 (HAN et al. 2015; CUI et al. 2018).

4. CONCLUSÕES

O extrato de mirtilo demonstrou potencial tipo-antidepressivo, bem como atenuou os parâmetros de estresse oxidativo alterados, apresentando-se como

uma ferramenta interessante de estudos frente as disfunções encontradas durante o episódio tipo-depressivo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELLEAU, E.L.; TREADWAY, M.T.; PIZZAGALLI, D.A. The Impact of Stress and Major Depressive Disorder on Hippocampal and Medial Prefrontal Cortex Morphology. **Biological Psychiatry**, v.85, p.443-453, 2019.

CHELIKANI, P.; FITA, I.; LOEWEN, P.C. Diversity of structures and properties among catalases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.61, p.192-208, 2004.

CUI, H.X.; CHEN, J.H.; LI, J.W.; CHENG, F.R.; YUAN, K. Protection of Anthocyanin from Myrica rubra against Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury via Modulation of the TLR4/NF-κB and NLRP3 Pathways. **Molecules**, v.23, p.1-12, 2018.

HAN, K.; KITANO-OKADA, T.; SEO, J.; KIM, S.; SASKI, K.; SHIMADA, K.; FUKUSHIMA, M. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins of adzuki bean extracts and their antioxidant activity. **Journal of Function Foods**, v.14, p.692-701, 2015.

HUANG, Y.; LANE, H.; LIN, C. New treatment strategies of depression: based on mechanisms related to neuroplasticity. **Neural Plasticity**, v.2017, p.1-11, 2017.

JIANG, X.; LIU, J.; LIN, Q.; MAO, K.; TIAN, F.; JING, C.; WANG, C.; DING, L.; PANG, C. Proanthocyanidin prevents lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice via neuroinflammatory pathway. **Brain Research Bulletin**, v.135, p.40-46, 2017.

LUYAO, M.; ZHENGHAI, S.; YAWEN, Z.; MINGCAN, L.; JIAZHEN, Y. Molecular Mechanism and Health Role of Functional Ingredients in Blueberry for Chronic Disease in Human Beings. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 9, p. 2785, 2018.

MAES, M.; GALECKI, P.; CHANG, Y.S.; BERK, M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. **Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.35, n.3, p.676-692, 2011.

MALHI, G.S.; MANN, J.J. Depression. **The Lancet**, v.392, n.10161, p.2299-2312, 2018.

PARK, H.S.; JUNG, H.Y.; PARK, E.Y.; KIM, J.; LEE, W.J.; BAE, Y.S. Cutting Edge: Direct Interaction of TLR4 with NAD(P)H Oxidase 4 Isozyme Is Essential for Lipopolysaccharide-Induced Production of Reactive Oxygen Species and Activation of NF-κappa B. Journal of Immunology, v.173, p.3589-3593, 2004.

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v.85, p.367-370, 1985.

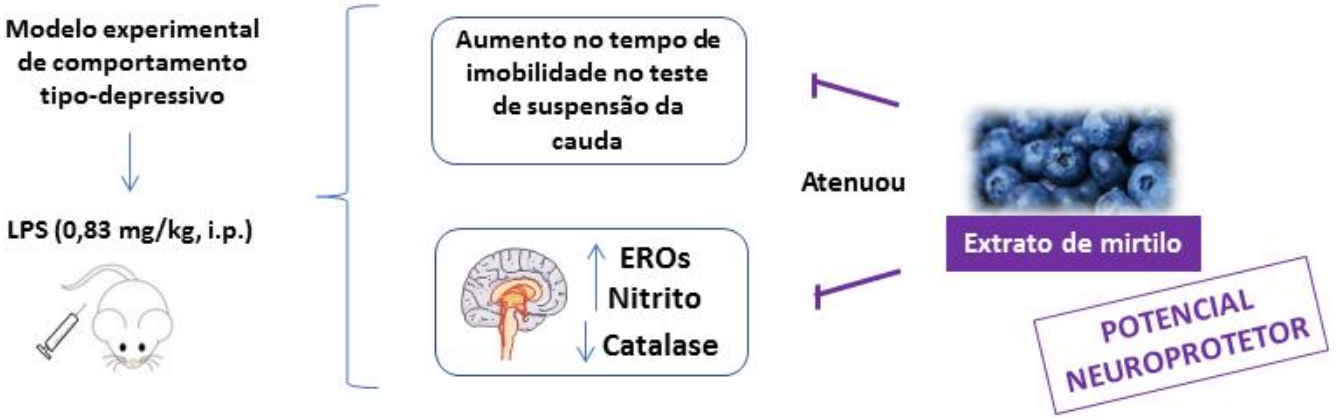
WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Depression and other common mental disorders**: Global Health Estimates. Acessado em 11 ago. 2020. Online. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254610/WHO-MSD-MER-2017.2-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

EXTRATO DE MIRTILO PREVINE COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO E ATENUA O ESTRESSE OXIDATIVO EM CÓRTEX CEREBRAL DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO LIPOPOLISSACARÍDEO

LUIZA SPOHR[1]; KARINA PEREIRA LUDUVICO[2]; NATÁLIA PONTES BONA[2]; MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES[1]; FRANCIELI STEFANELLO[2]; ROSELIA SPANEVELLO[1,3]





IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS COM POTENCIAL DE INTERAÇÃO COM SIGLEC1 APÓS A LIGAÇÃO AO HIV-1 EM CÉLULAS DENDRÍTICAS

MARIA CLARA MARTINS FERREIRA[1]; TAÍS MATOZO[2]; LETÍCIA KOGACHI[2]; TANIA CAROLINA REIS[2]; BRUNA CUNHA DE ALENCAR[3]
[1]Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo – mariacmartins@icb.usp.br
[2]Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo
[3]Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo – bruna.alencar@usp.br

1. INTRODUÇÃO

O HIV-1 é um retrovírus que infecta e causa depleção de linfócitos T CD4+, levando a uma imunodeficiência conhecida como síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Para que o vírus infecte uma célula, essa precisa apresentar em sua superfície o receptor CD4 e um correceptor de quimiocina (CCR5 ou CXCR4) (DEEKS et al., 2015). Apesar de células dendríticas (DCs) apresentarem tais receptores, DCs raramente se infectam produtivamente pelo HIV-1, mas são capazes de capturar vírus e mantê-los em compartimentos onde não são degradados. Tais compartimentos apresentam marcadores como as tetraspaninas CD9 e CD81 e são circundados por actina polimerizada (YU et al., 2015). DCs são capazes ainda de realizar transferência viral para células T CD4+ através do processo denominado trans-infecção. Acredita-se que a trans-infecção seja importante para a disseminação viral, especialmente nas etapas iniciais da infecção pelo HIV-1. A captura de HIV-1 por DCs maduras na trans-infecção é mediada pela lectina Siglec1 (IZQUIERDO-USEROS et al., 2012). Siglec1 possui afinidade por ácido siálico com ligações α2-3 ou α2-6, se ligando a gangliosídeos sialilados encontrados no envelope viral (KLASS & CROCKER, 2012). Todavia, pouco se sabe ainda sobre os mecanismos moleculares envolvidos na internalização de HIV-1 e sinalização por Siglec1 e se existem proteínas que auxiliem Siglec1 nesses processos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi identificar proteínas com potencial de interação com Siglec1 em DCs após incubação com partículas semelhantes a vírus (VLPs) de HIV-1. A identificação dessas vias pode trazer nova luz sobre a disseminação do HIV e possivelmente outros patógenos que se ligam ao Siglec1.

2. METODOLOGIA

2.1. Diferenciação e ativação celular

Foram utilizadas células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de dois doadores humanos saudáveis, obtidas a partir de sobras de aférese de plaquetas. Os PBMCs foram isolados por gradiente de densidade utilizando Ficoll. Os monócitos foram isolados por purificação magnética utilizando *beads* complexadas com anti-CD14 e diferenciados em DCs na presença de GM-CSF e IL-4 por 5 dias. No 5º dia, as células foram ativadas com lipopolissacarídeo (LPS) 100ng/mL por 24h para expressarem maiores quantidades de Siglec1.

2.2. Produção de VLPs de HIV-1

Para a produção de VLPs, células HEK293T foram transfectadas com o plasmídeo psPAX2 (contendo a sequência dos genes Gag, Pol, Rev e Tat do HIV-1). O meio foi trocado 8-16h após a transfecção e o sobrenadante recolhido 48h após. O sobrenadante contendo vírus foi filtrado (filtro 0,22 μm) e

posteriormente foi realizada uma centrifugação a 10.000 rpm por 2h sobre solução de sacarose 20% em tampão Tris, NaCl, EDTA. As VLPs presentes no pellet foram ressuspendidas em RPMI completo e quantificadas por ELISA.

2.3. Incubação de DCs com VLPs de HIV-1 e lise celular

As DCs ativadas com LPS foram incubadas com VLPs (416 ng de VLPs em 1,5 mL de RPMI por poço) no sexto dia por 1h a 37ºC em placas de 6 wells. Em seguida, as células foram lavadas 3x em PBS e lisadas em tampão de lise (TrisHCl 50mM, MgCl2 5mM, NP40 0,5%) com inibidor de protease. Após 30 minutos de incubação no gelo, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi salvo para quantificação proteica e co-imunoprecipitação.

2.4 Quantificação proteica e co-imunoprecipitação (co-IP)

A dosagem de proteínas do lisado celular foi realizada pelo método de Bradford e após quantificação, foi realizada a co-imunoprecipitação. A co-IP foi feita utilizando o kit Pierce Direct Magnetic IP/Co-IP (88828) da Thermo Scientific. O kit conta com um sistema de *beads* magnéticas ativadas, que foram acopladas com os anticorpos anti-Siglec1 e anti-isotipo controle. Nesse caso, o isotipo serviu como controle negativo, pois não possui especificidade para o alvo, mas corresponde à mesma classe e tipo do anticorpo principal. Após a co-IP, realizamos um Western Blotting para validar a presença de Siglec1 e outras proteínas de interesse nas amostras eluídas da co-IP.

2.5 Espectrometria de massas e identificação dos peptídeos

As amostras digeridas e dessalinizadas foram analisadas utilizando um sistema EASY-nLC™ 1200 de nano-fluxo acoplado a espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific) e os peptídeos foram identificados pelo software MaxQuant, utilizado um banco de proteínas revisado concatenado de *Homo sapiens* e HIV-1 (Uniprot).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversos fatores pró-inflamatórios associados à progressão da doença pelo HIV-1 estimulam a expressão de Siglec1 em células mieloides, como é o caso, por exemplo, do LPS bacteriano. Sendo assim, DCs de dois doadores foram ativadas com LPS para expressarem maiores quantidades de Siglec1. Depois, as DCs foram incubadas com VLPs de HIV-1 e lisadas. Foi possível confirmar por Western Blotting que o protocolo de imunoprecipitação de Siglec1 ocorreu de maneira satisfatória nas DCs dos dois doadores , visto que a banda correspondente à Siglec1 apareceu apenas na amostra eluída que fora previamente incubada com anti-Siglec1 (acoplado às *beads*) durante a co-IP, não sendo possível observar bandas significativas nas amostras do grupo isotipo controle (figura 1).

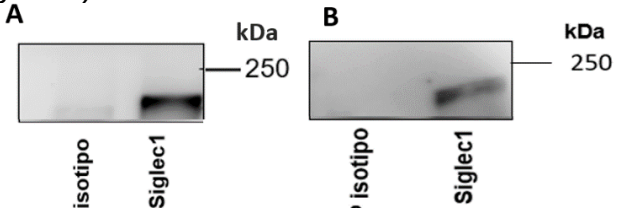


Figura 1. Western Blotting da imunoprecipitação de Siglec1 a partir do lisado de DCs derivadas de monócitos humanos. **(A)** Doador 1. **(B)** Doador 2.

Posterior à confirmação da imunoprecipitação de Siglec1, as amostras co-imunoprecipitadas dos dois doadores foram digeridas, dessalinizadas e enviadas para a espectrometria de massas. Após análises iniciais utilizando o software MaxQuant, foram identificadas em torno de 900 proteínas humanas em cada um dos quatro grupos: Isotipo doador 1 e 2, Siglec1 doador 1 e 2. As análises in silico forneceram também um grande volume de parâmetros. Sendo assim, foi necessário a aplicação de alguns filtros para uma análise mais refinada das proteínas. Nesse sentido, o parâmetro escolhido para a mineração dos dados foi o parâmetro *ms/ms count* normalizado. O *ms/ms count* informa quantos espectros foram identificados para tal peptídeo naquela amostra.

Foi estabelecido um valor de corte de 3x *ms/ms count* da razão grupo Siglec1/grupo isotipo. Ou seja, foram selecionadas as proteínas do doador em questão identificadas no grupo Siglec1 que apresentavam um valor de *ms/ms count* normalizado no mínimo três vezes maior em relação ao grupo isotipo do mesmo doador. Dessa forma, após a filtragem dos dados, 44 proteínas foram selecionadas no doador 1, 15 proteínas no doador 2 e 5 proteínas foram identificadas em comum entre os dois doadores (figura 2).

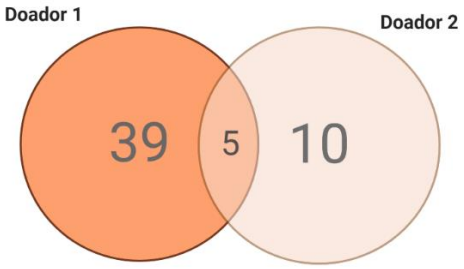


Figura 2. Diagrama de Venn indicando o número de proteínas co-imunoprecipitadas identificadas e filtradas in silico dos dois doadores.

As 5 proteínas selecionadas em comum entre os doadores foram: Siglec1, POTE anquirina membro J (POTEJ), plastina-2 (L-plastina), sintenina-1 e RNA polimerase II direcionada a DNA subunidade RPB3 (POL2RC). Ao realizar uma análise de *Gene Ontology,* foi possível observar que a maioria dessas proteínas apresentava funções correlacionadas ao citoesqueleto celular. Os componentes do citoesqueleto desempenham um papel importante na infecção pelo HIV-1, visto que o HIV-1 depende de diversas maquinarias da célula hospedeira para o sucesso de sua infecção. É válido destacar também que em DCs, o vírus é internalizado em um compartimento circundado por actina polimerizada, e que a presença de inibidores da polimerização ou despolimerização de actina prejudicam a formação do mesmo (YU et al., 2015).

Estruturalmente, as proteínas POTE contêm repetições centrais de anquirina e uma região C-terminal α-hélice de espectrinas. As repetições de anquirina medeiam interações proteína-proteína. Já as espectrinas, são constituintes do citoesqueleto que estão ancorados na membrana plasmática por meio de complexos de proteínas que incluem as anquirinas. Um fato interessante é que a L-plastina parece ter conexão com a proteína POTEJ, visto que as plastinas estão inseridas na família α-actinina (MORLEY, 2012). Outros membros da família α-actinina incluem as espectrinas, citadas anteriormente.

A L-plastina é uma proteína que cruza os filamentos de actina em feixes apertados, regulando a estabilidade de estruturas baseadas em actina, como podossomos e lamelipódios. A subversão da comunicação intercelular permite melhorar a replicação do HIV-1 através de uma multiplicidade de estruturas intercelulares e projeções de membrana, como estruturas tipo lamelipódios envolvidos na formação da sinapse virológica (BRACQ et al., 2018).

Também foram identificadas as proteínas sintenina-1 e a POL2RC. A sintenina-1 contém dois domínios PDZ em tandem, que estão envolvidos na formação de complexos macromoleculares que frequentemente ligam proteínas transmembranares ao citoesqueleto de actina (GORDÓN-ALONSO et al., 2012), podendo funcionar como uma molécula adaptadora que vincula processos de reconhecimento a sistemas de transdução de sinal intracelular. Através de seus domínios PDZ, a sintenina-1 também interage diretamente com a tetraspanina CD63 (LATYSHEVA et al., 2006). Como visto anteriormente, Siglec1 parece ser importante na formação compartimentos contendo vírus em DCs, e tais compartimentos apresentam tetraspaninas como marcadores. Além disso, em 2012, Gordón-Alonso e colaboradores publicaram um trabalho demonstrando que a regulação negativa da expressão da sintenina-1 reduz a polimerização da actina-F em resposta ao HIV-1.

4. CONCLUSÕES

Em suma, as proteínas com potencial de interação com Siglec1 identificadas sugerem que o citoesqueleto celular e as moléculas adaptadoras e de ligação parecem ter um importante papel nos processos de internalização e sinalização de HIV-1 por Siglec1 em DCs. Entretanto, mais estudos são necessários para a compreensão do interatoma Siglec-1/HIV-1.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRACQ, L.; XIE, M.; BENICHOU, S.; BOUCHET, J. Mechanisms for cell-to-cell transmission of HIV-1. **Frontiers in Immunology**, 2018.

DEEKS, S. G.; OVERBAUGH, J.; PHILLIPS, A.; BUCHBINDER, S. HIV infection. **Nature Reviews Disease Primers**, 2015.

GORDÓN-ALONSO, M.; ROCHA-PERUGINI, V.; ÁLVAREZ, S.; et al. The PDZ-adaptor protein syntenin-1 regulates HIV-1 entry. **Molecular Biology of the Cell**, 2012.

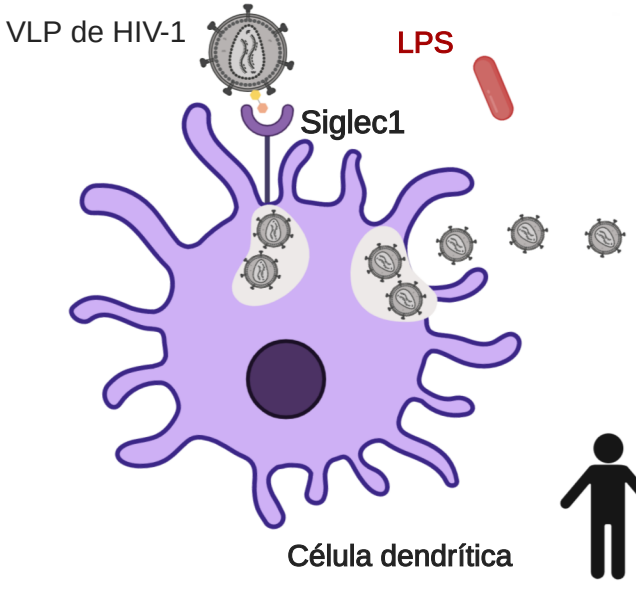
IZQUIERDO-USEROS, N.; LORIZATE, M.; PUERTAS, M. C.; et al. Siglec-1 Is a Novel Dendritic Cell Receptor That Mediates HIV-1 Trans-Infection Through Recognition of Viral Membrane Gangliosides. **PLoS Biology**, 2012.

KLAAS, M.; CROCKER, P. R. Sialoadhesin in recognition of self and non-self. Seminars in Immunopathology. **Anais...** , 2012.

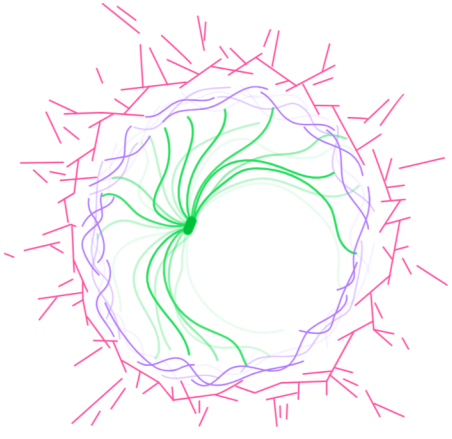
LATYSHEVA, N.; MURATOV, G.; RAJESH, S.; et al. Syntenin-1 Is a New Component of Tetraspanin-Enriched Microdomains: Mechanisms and Consequences of the Interaction of Syntenin-1 with CD63. **Molecular and Cellular Biology**, 2006.

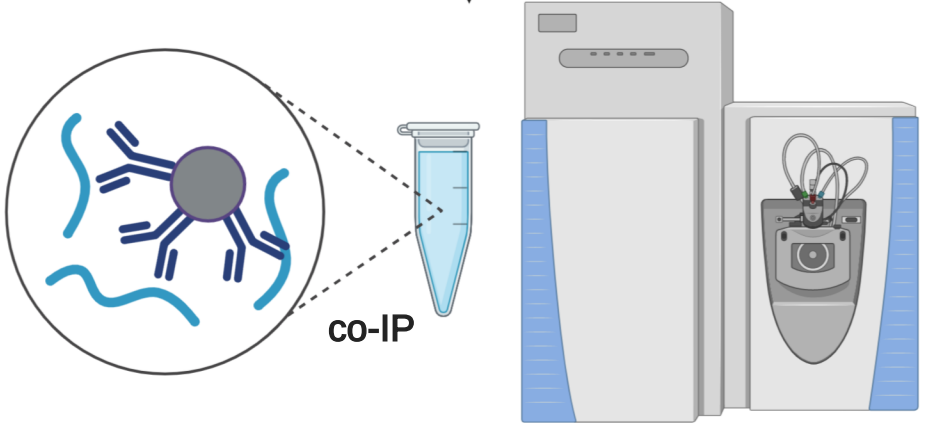
MORLEY, S. C. The actin-bundling protein L-plastin: A critical regulator of immune cell function. **International Journal of Cell Biology**, 2012.

YU, X.; XU, F.; RAMIREZ, N. G. P.; et al. Dressing up nanoparticles: A membrane wrap to induce formation of the virological synapse. **ACS Nano**, 2015.

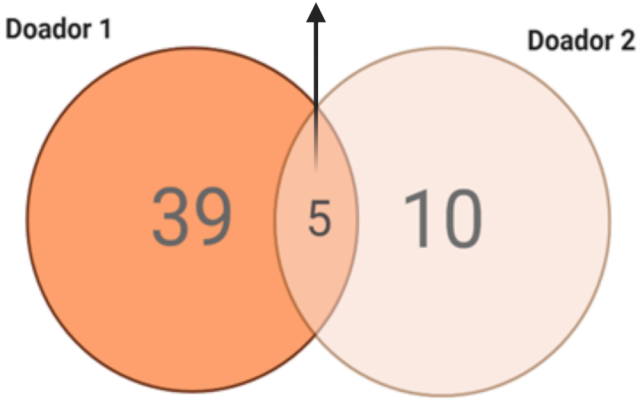


citoesqueleto celular





Espectrometria de massas



AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA VIA DOPAMINÉRGICA NO EFEITO DO TIPO ANTIDEPRESSIVO DO COMPOSTO 2-FENIL-3-(FENILSELANIL)BENZOFURANO EM CAMUNDONGOS

TAÍS DA SILVA TEIXEIRA RECH[1]; DIANER NORNBERG STRELOW[2], LETÍCIA DEVANTIER KRÜGER[2], JOSÉ SEBASTIÃO SANTOS NETO[3], CÉSAR AUGUSTO BRÜNING[2], CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO[4]

[1,2,4]Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM) – taisteixeira.r@gmail.com, dianer_strelow@hotmail.com, leticiadevantier@hotmail.com, cabruning@yahoo.com.br, cbortolatto@gmail.com.
[3]Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina- zeneto.qmc@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A depressão afeta cerca de 350 milhões de indivíduos em todo o mundo, se caracterizando por humor deprimido, dificuldade de concentração, e demais sintomas que trazem prejuízos na qualidade de vida dos indivíduos (BAINS e ABDIJADID, 2020). A fisiopatologia da depressão não é claramente definida, mas evidências apontam que a disfunção na disponibilidade de neurotransmissores, em destaque as monoaminas, esteja envolvida (CHAND e ARIF, 2020). A dopamina é um importante neurotransmissor envolvido em múltiplas disfunções associados à depressão, como no sistema de recompensa, estímulos emocionais e excitação motivacional (RINCON-CORTES e GRACE, 2020). Sendo assim, o sistema dopaminérgico é pesquisado para fármacos antidepressivos, apresentando efeitos com potencial terapêutico em modelos animais (SAMPAIO et al., 2020).

Compostos orgânicos contendo o microelemento selênio (Se) têm sido alvo de estudo para o tratamento de depressão (ZBOROWSKI et al., 2020). O composto híbrido apresentando Se e o núcleo benzofurano, 2-fenil-3-(fenilselanil)benzofurano (SeBZF**1**), vem sendo estudado por nosso grupo de pesquisa. Já foram demonstradas sua atividade antioxidante *in vitro* bem como sua ação do tipo antidepressiva em camundongos mediada pela via serotoninérgica (GALL et al., 2020).

Diante do exposto, este trabalho tem por objetivo a investigação do envolvimento da via dopaminérgica na ação do tipo antidepressiva do composto SeBZF**1** em camundongos.

2. METODOLOGIA

2.1. Animais

Os procedimentos realizados foram aprovados pelo COCEPE sob o código 8784 e pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEA/UFPel 4897-2017). Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, pesando entre 25 e 35 gramas, n = 8-10/grupo.

2.2. Drogas

O composto SeBZF**1** (Figura 1) foi sintetizado pelo Laboratório de Síntese, Reatividade, Avaliação Farmacológica e Toxicológica de Organocalcogênios (CCNE) da Universidade Federal de Santa Maria. O haloperidol foi adquirido da Janssen-Cilag Farmacêutica, e solubilizado em solução salina 0,9%. O composto foi diluído em óleo de canola e administrado em um volume fixo de 10 ml/kg.



Figura 1. Estrutura química do SeBZF**1**

2.3 Protocolo experimental

Para a avaliação do envolvimento do sistema dopaminérgico na ação do tipo antidepressiva do SeBZF**1**, os animais foram submetidos ao teste da suspensão pela cauda (TSC). Neste teste, os animais ficam suspensos pela cauda, com uma fita adesiva presa ao aparato de madeira durante o tempo de 6 minutos. Foram avaliados o tempo de latência para o primeiro episódio de imobilidade e o tempo total em que o animal permaneceu imóvel (STERU et al., 1985). Realizou-se uma curva dose-resposta do haloperidol, um antagonista não seletivo dos receptores de dopamina, onde os animais foram tratados com haloperidol (0,05 a 0,20 mg/kg, via intraperitoneal, i.p.) ou veículo (solução salina 0,9%, i.p.) e, após 30 minutos, realizou-se o TSC. Imediatamente antes do TSC, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto (TCA) (WALSH e CUMMINS, 1976), para avaliar a atividade exploratória e locomotora dos animais, descartando resultados falsos-positivos do TSC. Após a seleção de dose do antagonista dopaminérgico, os animais foram tratados com haloperidol (0,05 mg/kg, i.p.) ou solução salina e, após 15 minutos, receberam o SeBZF**1** (50 mg/kg, via oral, v.o.) (Gall et al., 2020) ou óleo de canola (veículo). Depois de 30 minutos, os animais foram submetidos ao TSC (e TCA).

2.4 Análise Estatística

Utilizou-se o software GraphPad Prism versão 8.2.0 para análise dos dados. A distribuição normal dos dados foi testada pelo teste D'Agostino-Pearson Omnibus. O teste ANOVA de uma ou duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Newman–Keuls foi utilizado para comparações entre os grupos experimentais. Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M), sendo valores de $p<0,05$ considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A curva dose-resposta do haloperidol demonstrou que as doses de 0,10 e 0,20 mg/kg apresentaram um efeito *per se* no TSC, através da diminuição do tempo de latência para o primeiro episódio de imobilidade [$F_{(1, 30)} = 17,47$; $p<0,0001$] (Fig. 2A) e também pelo aumento do tempo total de imobilidade [$F_{(1, 30)} = 30,53$; $p<0,0001$] (Fig. 2B). Por outro lado, a dose de haloperidol de 0,05 mg/kg, não apresentou diferença significativa na imobilidade em relação ao grupo controle, sendo, portanto, selecionada para a investigação do envolvimento do SeBZF**1** com o sistema dopaminérgico no efeito do tipo antidepressivo do composto.

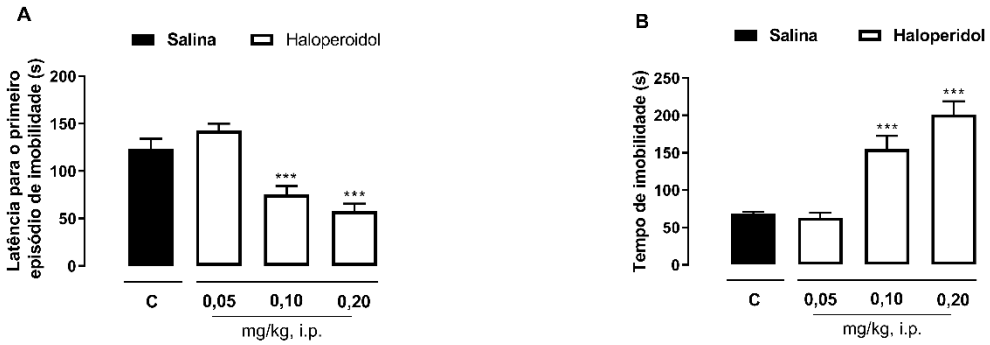


Figura 2. Curva dose-resposta para o haloperidol (0,05 a 0,20 mg/kg, i.p., um antagonista não seletivo dos receptores de dopamina) no TSC em camundongos. (2A) Tempo de latência para o primeiro episódio de imobilidade (s); (2B) tempo total de imobilidade (s). Valores expressos como média ± E.P.M. (n=8-10/grupo), analisados por ANOVA de uma via/ Newman–Keuls. $^{***}p<0,0001$ quando comparado ao grupo controle (C).

A análise ANOVA de duas vias revelou interação entre SeBZF**1** e haloperidol (Figura 3) para a latência (3A) [$F_{(1, 35)} = 15,08$; p=0,0004 e também para o tempo total de imobilidade (3B) [$F_{(1, 35)} = 9,48$; p=0,0040]. Como esperado, o composto SeBZF**1** demonstrou efeito do tipo antidepressivo em sua dose efetiva (50 mg/kg) para o primeiro episódio de imobilidade (p<0.001) e para o tempo total de imobilidade (p<0.01). A análise *post hoc* revelou que o pré-tratamento com o haloperidol, antagonista não seletivo dos receptores de dopamina, bloqueou os efeitos do tipo antidepressivo do composto no TSC (p< 0,001 e 0,01, respectivamente).

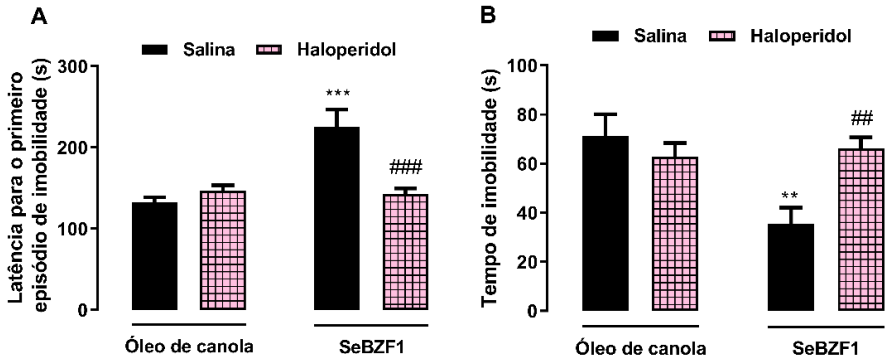


Figura 3. Efeitos do pré-tratamento de haloperidol (0,05 mg/kg,i.p., um antagonista não seletivo dos receptores de dopamina) na ação do tipo antidepressiva do SeBZF**1** (50 mg/kg, v.o.) em camundongos submetidos ao TSC. (3A) Tempo de latência para o primeiro episódio de imobilidade; (3B) tempo total de imobilidade. Valores expressos como média ± E.P.M. (n=9-10/grupo), analisados por ANOVA de duas via seguido por Newman–Keuls. $^{***}p<0,0001$ quando comparado ao grupo controle (óleo de canola + salina), e $^{###}p<0,0001$ quando comparado ao grupo SeBZF**1**.

Os efeitos dos diferentes tratamentos no TCA estão demonstrados na tabela 1. Na curva dose-resposta para o haloperidol, observou-se uma redução no número de cruzamentos nas doses de 0,1 e 0,2 mg/kg [$F_{(1, 30)} = 4,64$; p=0,0088] em relação ao grupo controle, o que não ocorreu com a dose de 0,05. O número de levantamentos sobre as patas posteriores na curva dose-resposta não foi afetado [$F_{(1, 30)} = 1,17$;

p=0,3367]. Durante o experimento onde testou-se o efeito do haloperidol em associação ao SeBZF1, não houveram diferenças significativas entre os grupos experimentais ([$F_{(1, 35)}$ = 1,16; p=0,2880] e [$F_{(1, 35)}$ = 1,72; p=0,1983]).

Tabela 1. Efeitos dos diferentes tratamentos no TCA.

Tratamento	Grupos	Nº de cruzamentos	Nº de levantamentos sobre as patas posteriores
Curva dose-resposta (haloperidol)	Controle	92,70 ± 6,56	36,80 ± 4,10
	0,05 mg/kg	78,88 ± 5,90	29,25 ± 2,05
	0,10 mg/kg	66,38 ± 3,92*	32,50 ± 2,56
	0,20 mg/kg	63,38 ± 8,23*	29,63 ± 3,63
Haloperidol x SeBZF**1**	Controle	87,33 ± 8,24	29,33 ± 5,11
	Haloperidol 0,05 mg/kg	77,50 ± 6,94	27,00 ± 2,51
	SeBZF**1**	70,80 ± 6,75	20,80 ± 3,63
	Haloperidol + SeBZF**1**	76,60 ± 7,11	28,10 ± 3,27

*p<0,05 quando comparado ao grupo controle. One-way ou two-way ANOVA/Newman-keuls.

4. CONCLUSÕES

Diante do exposto, pode-se inferir uma relação entre a ação do tipo antidepressiva do composto SeBZF**1** e a via dopaminérgica em camundongos, visto que a pré-administração de um antagonista não seletivo dos receptores de dopamina foi capaz de bloquear o efeito do tipo antidepressivo do composto. São necessários mais estudos para compreensão do envolvimento desta via através de receptores específicos, bem como o envolvimento de outras vias na ação terapêutica do SeBZF**1**.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAINS, N.; S. ABDIJADID. Major Depressive Disorder. **StatPearls** (Treasure Island (FL)), 2020.

CHAND, S. P.; H. ARIF. Depression. **StatPearls** (Treasure Island (FL)), 2020.

GALL, J. I; et al.. Insights into serotonergic and antioxidant mechanisms involved in antidepressant-like action of 2-phenyl-3-(phenylselanyl)benzofuran in mice. **Progress in Neuropsychopharmacol & Biological Psychiatry**, 102: 109956, 2020.

RINCON-CORTES, M.; A. A. GRACE. Antidepressant effects of ketamine on depression-related phenotypes and dopamine dysfunction in rodent models of stress. **Behavioural Brain Research**, 379: 112367, 2020.

SAMPAIO, T. B.; et al.. Dopaminergic system contribution to the antidepressant-like effect of 3-phenyl-4-(phenylseleno) isoquinoline in mice. **Behavioural Brain Research**, 386: 112602, 2020.

STERU, L.; et al.. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology (Berl),** 85: 367-70, 1985.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The Open-Field Test: a critical review. **Psychologycal Bulletin**, 83: 482-504, 1976.

ZBOROWSKI, V. A.; et al.. A. Keap1/Nrf2/HO-1 signaling pathway contributes to p-chlorodiphenyl diselenide antidepressant-like action in diabetic mice. **Psychopharmacology (Berl)**, 237: 363-74, 2020.

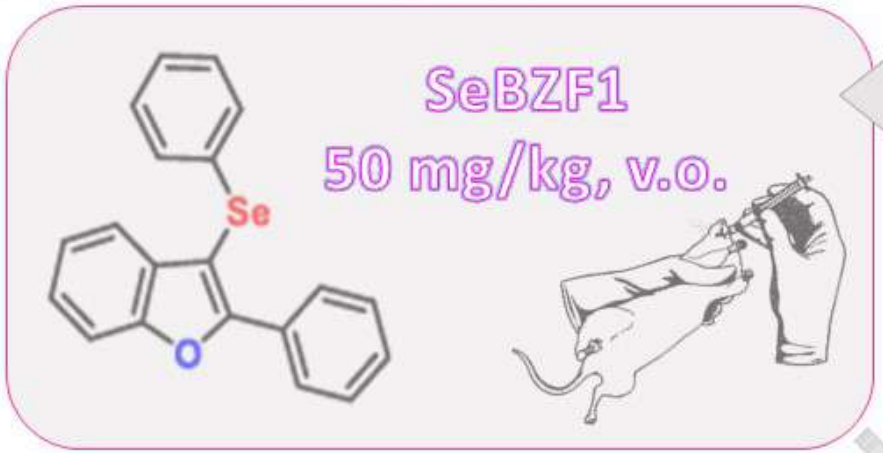
VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA VIA DOPAMINÉRGICA NO EFEITO DO TIPO ANTIDEPRESSIVO DO COMPOSTO 2-FENIL-3-(FENILSELANIL)BENZOFURANO EM CAMUNDONGOS

TAÍS DA SILVA TEIXEIRA RECH[1]; DIANER NORNBERG STRELOW[2], LETÍCIA DEVANTIER KRÜGER[2], JOSÉ SEBASTIÃO SANTOS NETO[3], CÉSAR AUGUSTO BRÜNING[2], CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO[4]

Haloperidol: antagonista não seletivo dos receptores de dopamina (0,05 mg/kg, i.p.)

15' depois





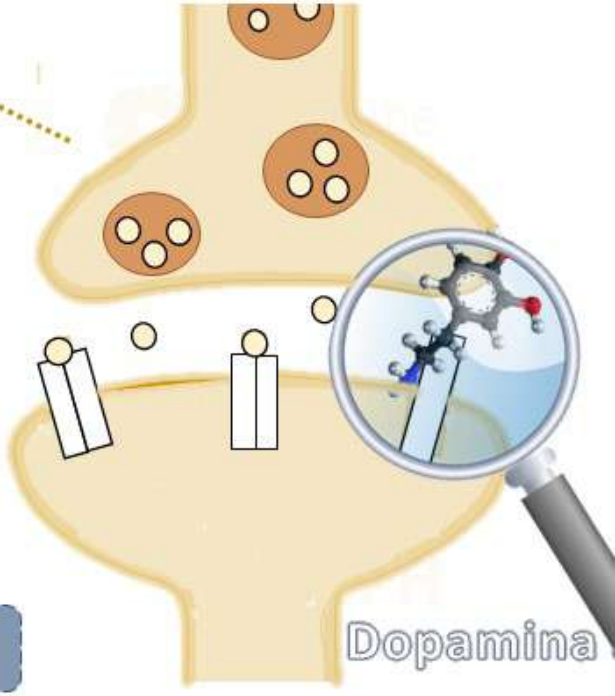
Teste do Campo Aberto

30'

Teste da Suspensão pela cauda

Envolvimento da via dopaminérgica





TALK SCIENCE AT HOME: DIVULGAÇÃO REMOTA DA CIÊNCIA E DA BIOTECNOLOGIA

AIRTON SINOTT; AMANDA SILVA HECKTHEUER[2], LUIZ FILIPE BASTOS MENDES[3]; JULIETI HUCH BUSS[4]; VANESSA GALLI[5], PRISCILA MARQUES MOURA DE LEON[6]

[1]Universidade Federal de Pelotas - UFPel – antsinott@gmail.com
[2]Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC– amandasheck@hotmail.com
[3]UFPel – luizfbmendes@gmail.com
[4]Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS- julietibuss@hotmail.com
[5]UFPel - vane.galli@yahoo.com.br
[6]UFPel – primleon@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Devido ao fato de que cada vez mais a sociedade está conectada às mídias sociais, surge a necessidade de incluí-las como uma ferramenta de ensino e de popularização da ciência. Nos dias de hoje, a Biotecnologia impacta a sociedade por meio de melhorias significativas através da geração de novas tecnologias em diferentes áreas. Porém, devido a dificuldade de traduzir os acontecimentos científicos em linguagens compreensíveis, surge a necessidade de desenvolver projetos visando o intercâmbio de conhecimentos entre a academia e a população em geral (ALBUQUERQUE, 2011; NATURE 2017; NAVAS, 2020).

Como uma estratégia para a difusão de conhecimentos biotecnológicos, alunos da Graduação em Biotecnologia (G-Biotec) do CDTec/UFPel planejaram e executaram o projeto unificado com ênfase em ensino (código PRE: 812019) denominado Talk Science. A ideia do projeto foi inspirada no *Pint of Science*, evento internacional que busca reunir cientistas e a comunidade em restaurante e bares para discutir desenvolvimentos científicos contemporâneos de uma forma acessível e interessante (BBC NEWS, 2015). O Talk Science já realizou três edições em bares da cidade de Pelotas: a primeira sobre "Internacionalização da ciência" em 2018, e duas edições em 2019, ''CRISPR: O Photoshop do DNA" e "Do laboratório para a mesa".

Com o início do distanciamento social recomendado pela Organização Mundial da Saúde para conter o avanço da pandemia da COVID-19, surgiu a necessidade do Talk Science se reinventar. Foi constatado um aumento significativo no uso de mídias sociais durante a quarentena, refletindo na migração de diversos segmentos para a era digital (G1, 2020). Dessa forma, iniciamos em busca de uma equipe qualificada para a efetuação da divulgação científica remota e escolha da plataforma e meios para divulgação do projeto.

O Instagram é considerado um dos aplicativos mais promissores da atualidade, permitindo o compartilhamento de fotos e vídeos, e também a comunicação entre os usuários por meio de curtidas e comentários (PATEL, 2019). Visto isso, escolhemos o Instagram como nossa ferramenta para o "Talk Science at home", devido ao grande aceite e amplo leque de ferramentas disponíveis na plataforma. Além disso, o uso de mídias digitais representa um rompimento de barreiras, promovendo um fácil e inclusivo acesso do conhecimento técnico-científico (NAVAS, 2020).

A utilização do Instagram na área de divulgação científica da Biotecnologia torna-se uma estratégia de ensino cativante, na medida em que promove uma maior integração entre os seguidores. Visto isso, o objetivo do trabalho foi avaliar o impacto das publicações realizadas pelo perfil @TalkScience_, bem como o alcance dos quadros “Notícia” e “Artigo”, a fim de contribuir com o desempenho e organização das próximas publicações.

2. METODOLOGIA

Para o desenvolvimento das atividades do “Talk Science at home”, foi realizado um processo seletivo *online* (SEI_23110.016039_2020_59) para captação de novos colaboradores. Perguntas como disponibilidade de horário, cumprimento de metas, motivação para ingresso no projeto, novas ideias e habilidades extras foram captadas por meio de um formulário digital. Além disso, foi realizado uma segunda etapa de seleção, composta por uma entrevista remota com os membros do projeto e os inscritos.

Como o projeto está sendo desenvolvido *online*, para o planejamento são executadas reuniões sistemáticas pelas plataformas do Google meets e web conferência da UFPEL, como parte das atividades do projeto unificado, coordenado pela professora Priscila Marques Moura de Leon. As reuniões entre os membros colaboradores (docentes e discentes) foram essenciais para a elaboração de um plano organizado abrangendo tipos de postagens, periodicidade de publicação e também criação de uma identidade visual.

Durante as reuniões, foi escolhido o *software online* para criação das postagens. Foi determinado o uso da plataforma Canva (https://www.canva.com/) por apresentar uma simplicidade e fácil manuseio para a criação de publicações artísticas. Além disso, para nossa identidade visual foram determinadas cores específicas para cada tipo de publicação, além de um visual simples e descontraído. A partir das ideias dos colaboradores foram produzidos oito quadros, neste resumo destaca-se os quadros: ‘’Notícia’’ e ‘’Artigo’’.

O quadro “Notícia’’ surgiu com a proposta explicar os fundamentos de notícias divulgada por veículos de imprensa, como exemplo Folha de São Paulo e G1. A necessidade desse quadro surgiu pois o grupo observa que frequentemente as publicações científicas são divulgadas de maneira simplificada, promovendo o seu entendimento superficial. Assim, é realizada a explicação de uma notícia atual de forma completa e didática, proporcionando um maior entendimento sobre o tema apresentado.

Também foi acordado em reunião a distribuição de sete temas que retratam a multidisciplinariedade da Biotecnologia para serem abordados no quadro “Artigo”. Esses são: Bioenergia, Saúde humana, Saúde animal, Agricultura, Insumos, Bioinformática e Meio ambiente. Os tópicos foram distribuídos entre os colaboradores, realizando assim uma periodicidade de publicações. Este quadro tem como finalidade explicar artigos científicos atuais e complexos de cada área do conhecimento, apresentando de forma acessível as metodologias empregadas, os resultados obtidos e o fundamento teórico apresentado, como exemplo a publicação sobre a vacina de Oxford contra o novo coronavírus.

Após as reuniões, foi decidido a periodicidade das publicações sendo adotado um calendário organizado contemplando três publicações semanais dividida entre os colaboradores do projeto. As publicações são agendadas para postagens as seis horas da tarde dos dias determinados, visto que nesse horário foi observado maior alcance na rede social.

Para análise de dados deste projeto foram coletados dados fornecidos pela própria plataforma do Instagram e Creator Studio - desenvolvido pelo Facebook e Instagram. Os dados coletados foram: curtidas da publicação, alcance das publicações, dias com maior visualização e crescimento do projeto.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao final do prazo de inscrições para colaboradores do projeto, obtivemos 19 inscritos de diversos semestres do curso de graduação em Biotecnologia e também externos de outras instituições de ensino. Desse modo foi escolhido um colaborador do terceiro semestre, um do sétimo e um egresso do curso. Com estes novos colaboradores foi possível dar início ao projeto e suprir a demanda necessária para as postagens no perfil do projeto.

Com o início do projeto ‘’Talk Science at home’’ o perfil do Instagram do Talk Science obteve 423 novos seguidores, o que representa um crescimento de 142% (Fig 1A). Com os dados da 2° semana de agosto, o conteúdo da página alcançou 623 contas distintas (Fig 1B), o que representa 87% dos seguidores, mostrando um grande impacto e engajamento. Entre os dias de maiores acessos ao perfil, foi visto que sábado é o dia de maior predominância (Fig 1C). No dia 15 de agosto de 2020 o perfil @TalkScience_ conta com 719 seguidores e entre eles, a maioria dos seguidores está entre a faixa etária de 18 a 24 anos (Fig 1D).

Com os dados apresentados, mostra-se um expressivo engajamento constante na página, o que auxilia a popularização da ciência e mostra a aceitação nas postagens propostas. A faixa etária pode ser resultante do perfil de seguidores ser do meio universitário e as visitas aumentam aos sábados pois é nesse dia que Talk Science segue novos perfis, o que atrai novos seguidores.

Até o momento foram publicadas as notícias: “Embrapa coleta bactérias e fungos com potencial econômico na Amazônia’’ do Jornal Cruzeiro do Sul, e “Brasileiros descobrem molécula que promove aumento da massa muscular’’ da AUSPIN. A primeira, postada em 17/07, obteve 49 curtidas; a segunda, publicada em 14/08, obteve 46 curtidas. Os artigos “Uso de microrganismos para produção de bioenergia’’, publicado em 22/07, com 63 curtidas e “Avaliação preliminar das fases 1/2 da vacina contra SARS-CoV-2’’, em 04/08, com 88 curtidas. Podemos observar que a publicação relacionada ao novo Coronavírus resultou em um maior alcance, visto a curiosidade despertada por esse assunto. Apesar da segunda notícia apresentar menos curtidas que a primeira, deve ressaltar que estes são os dados de apenas 1 dia após a sua publicação. O crescimento da página também aumentou, com uma diferença de mais de 100 seguidores entre as publicações, o que aumenta as curtidas e engajamento, com isso o protejo tem maior alcance.

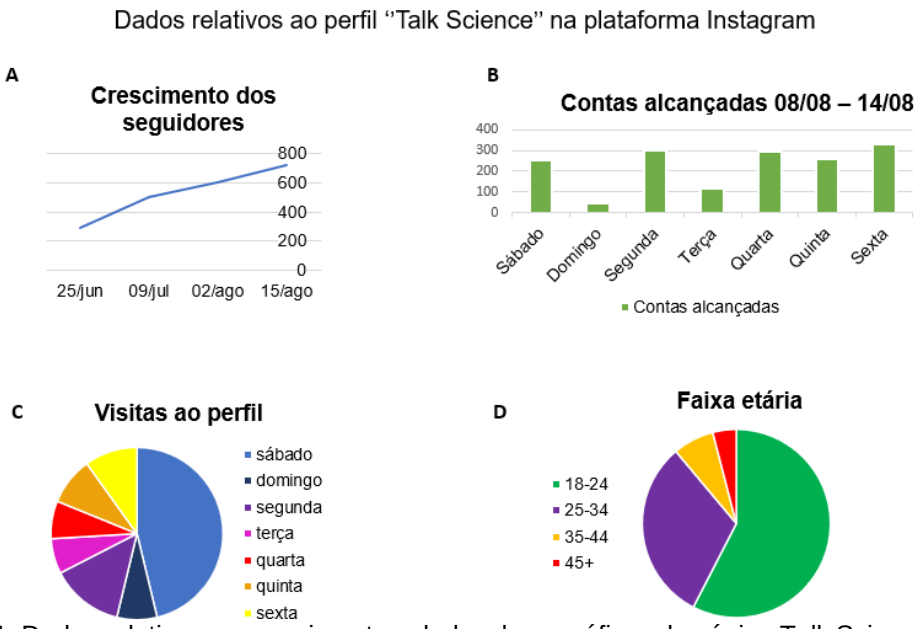


Figura 1: Dados relativos ao crescimento e dados demográficos da página Talk Science at home. (A) Crescimento dos seguidores entre julho e agosto; (B) Contas que receberam o conteúdo da nossa página a cada dia, sendo delas 623 únicas; (C) Visitas ativas ao perfil, (D) Faixa etária dos seguidores.

4. CONCLUSÕES

O "Talk Science at home" apresentou sucesso na difusão da Biotecnologia com a comunidade através do Instagram. Por meio de *posts* explicando conteúdos científicos complexos apresentados em artigos e notícias de uma maneira acessível, promovendo uma maior visibilidade e divulgação da ciência e do conhecimento que é gerado acerca da Biotecnologia. Cada vez mais as postagens refletem uma aceitação positiva do público, o que aumenta o alcance da página e os seus acessos. O projeto proporcionou o crescimento acadêmico dos envolvidos, desafiando os mesmos a apresentar termos científicos em uma linguagem descomplicada. Futuramente, espera-se aumentar o número de quadros para proporcionar o crescimento do projeto, tendo como objetivo atingir a meta de mil seguidores até final do ano.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, F.F.D. **Divulgação Científica e Ciência da informação**. 2011. 79f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel) - Curso de Biblioteconomia e Documentação. Universidade de São Paulo.

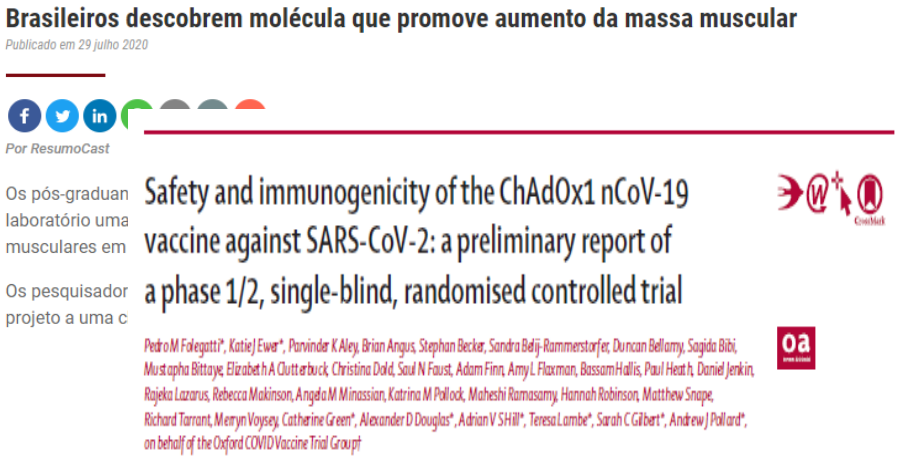
BBC NEWS, 2015. Acessado em 15 de agosto de 2020. Online. Disponível em: https://www.bbc.co.uk/news/uk-england-22522359

Mapeamento mostra aumento do consumo de mídia online no Brasil durante a quarentena, G1 GLOBO, 2020. Acessado em 15 de agosto de 2020. Online. Disponível em: https://g1.globo.com/economia/midia-e-marketing/noticia/2020/04/16/mapeamento-mostra-aumenta-consumo-de-midia-online-no-brasil-durante-a-quarentena.ghtml

NAVAS, Ana Luiza Gomes Pinto et al . Divulgação científica como forma de compartilhar conhecimento. **CoDAS**, São Paulo, v. 32, n. 2, e20190044, 2020

NATURE BIOTECHNOLOGY, 2017. Acessado em 15 agosto de 2020. Online. Disponível em: http://www.nature.com/subjects/biotechnology

Instagram o que é, NEIL PATEL, 2019. Acessado em 15 de agosto de 2020. Online. Disponível em: https://neilpatel.com/br/blog/instagram-o-que-e/


Brasileiros descobrem molécula que promove aumento da massa muscular

Publicado em 29 julho 2020

Por ResumoCast

Os pós-graduan
laboratório uma
musculares em

Os pesquisador
projeto a uma c

Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial

Pedro M Folegatti*, Katie J Ewer*, Parvinder K Aley, Brian Angus, Stephan Becker, Sandra Belij-Rammerstorfer, Duncan Bellamy, Sagida Bibi, Mustapha Bittaye, Elizabeth A Clutterbuck, Christina Dold, Saul N Faust, Adam Finn, Amy L Flaxman, Bassam Hallis, Paul Heath, Daniel Jenkin, Rajeka Lazarus, Rebecca Makinson, Angela M Minassian, Katrina M Pollock, Maheshi Ramasamy, Hannah Robinson, Matthew Snape, Richard Tarrant, Merryn Voysey, Catherine Green*, Alexander D Douglas*, Adrian V S Hill*, Teresa Lambe*, Sarah C Gilbert*, Andrew J Pollard*, on behalf of the Oxford COVID Vaccine Trial Group†



- 423 novos seguidores.
- Crescimento de 124%
- Sábado com maior acessos diretos
- Alcance de 623 contas em uma semana.

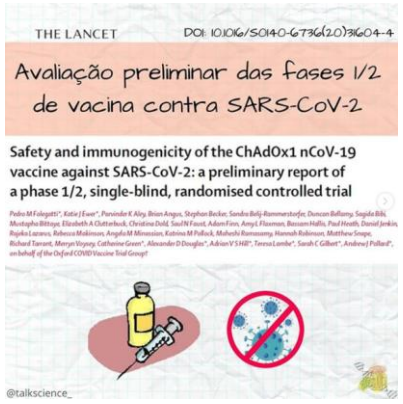
Reuniões sistemáticas



Captações de artigos e notícias

Criação de conteúdo

Canva



04 de agosto
88 curtidas



14 de agosto
46 curtidas

Publicação no Instagram

SERVIÇO DE ONCOLOGIA VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS (SOVET-UFPEL)

ALINE DO AMARAL[1]; CLARISSA CAETANO DE CASTRO[2];LUÍSA GRECCO CORRÊA[3];LUÍSA MARIANO CERQUEIRA DA SILVA[4]; THOMAS NORMANTON GUIM[5];CRISTINA GEVEHR FERNANDES[6]

[1]Universidade Federal de Pelotas – amaralaaline@gmail.com
[2] Universidade Federal de Pelotas – clarissac.decastro@gmail.com
[3] Universidade Federal de Pelotas – luisagcorrea@gmail.com
[4]Universidade Federal de Pelotas – luisamarianovet@yahoo.com.br
[5]Universidade Federal de Pelotas – thomasguim@hotmail.com
[6]Universidade Federal de Pelotas – crisgevf@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida dos animais leva a ocorrência de patologias relacionadas à idade, estando as neoplasias entre elas (PAOLONI; KHANNA, 2007). As neoplasias decorrem da proliferação autônoma e desordenada, pelo acúmulo progressivo de mutações no genoma celular, induzindo a ruptura irreversível de mecanismos homeostáticos, responsáveis pela regulação de crescimento, diferenciação e morte celular (HORTA; LAVALLE, 2013). A neoplasia é considerada a principal causa de óbito em animais de idade avançada e a segunda principal causa em animais jovens (BENTUBO et al., 2013). Com isso, há uma maior procura por profissionais especializados em oncologia veterinária (BALDIN et al., 2005).

O diagnóstico precoce é um fator de extrema importância no prognóstico do paciente oncológico, possibilitando um tratamento mais eficaz e melhor qualidade de vida ao animal. Algumas neoplasias são mais frequentes e passíveis de serem prevenidas (HOFF et al., 2017).

Neste sentido, desde 2006, o projeto no Serviço de Oncologia Veterinário da Universidade Federal de Pelotas (SOVet-UFPel) foi criado visando suprir a necessidade de um atendimento especializado em oncologia. Inicialmente as atividades eram desenvolvidas em conjunto com outros projetos da Faculdade de Veterinária e em 2016 passou a atuar de forma independente com gestão própria. O SOVet desenvolve atividades educativas e presta serviços em duas áreas: SOVet clínica que oferece atendimento clínico no Hospital de Clínicas Veterinário (HCV-UFPel) e o SOVet patologia localizado no Departamento de Patologia Animal e que presta serviço de diagnóstico anatomopatológico para clínicas particulares de Pelotas e região e para o HCV-UFPel.

Assim sendo, o presente trabalho descreve a atuação do SOVet em campanhas de conscientização à comunidade e demonstra a casuística de materiais encaminhados ao SOVet patologia.

2. METODOLOGIA

Para a elaboração do presente trabalho, foi realizado uma análise de todas as ações educativas realizadas pelo SOVet durante o período de 2016 a julho de 2020. Através do sistema de banco de dados e emissão de laudos (SIG-SOVET) gerou-se um levantamento de todas amostras recebidas para diagnóstico anatomopatológico neste mesmo período.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O SOVet esteve presente em 15 eventos no período de 2014 a 2019, sendo esses realizados em clínicas veterinárias, pet shops, praças e ONGs. Além da participação em eventos, o SOVet-UFPel organizou eventos de 2014 a 2019, que se deram como culminância das campanhas "Outubro Rosa" e "Ação contra o câncer em animais". Já em 2020, em virtude da pandemia do COVID-19 não permitir eventos públicos, estão sendo elaborados postagens semanais sobre diversos tipos de neoplasias, a fim de manter a divulgação do trabalho e levar informação à comunidade. (Tabela 1). Assim, tanto nas ações realizadas presencialmente como nas de caráter remoto, o grupo alcança seu objetivo de disseminar informações e orientações sobre diagnóstico, prevenção e tratamento do câncer em animais.

Tabela 1. Relação de atividades realizadas pelo SOVet-UFPel (2014-2020).

Ano	Atividade
2014	Campanha Contra o câncer de Mama Canino*
2015	Outubro Rosa Pet*
2016	1º Pet Stop Arraiá do Cão Outubro Rosa Pet e Novembro Azul Canino**
2017	Chima Dog Arraiá do Cão Outubro Rosa Pet*
2018	Pet Show Fest Feira Nacional do Doce Aniversário Pet Shop Entre Patas e Pelos 1ª Semana de Proteção Animal
2019	Universidade na Rua Pet Shop Central Pet Feira Nacional do Doce Feira do Livro de Pelotas Arraiau-"au" 1ª Semana de Proteção Animal
2020	Temas abordados em postagens semanais em redes sociais: Melanoma; Carcinoma de Células Escamosas (CCE); CCE em gatos; Linfoma em Cães; Linfoma em Gatos; Mastocitomas; Hemangioma; Hemangiossarcoma; Carcinoma em Tumor Misto de Mama; Carcinoma Cribriforme de Mama

* Organizado pelo SOVet
** Organizado pelo SOVet em parceria com o ReproPel

Nas atividades educativas realizadas nos eventos, a abordagem foi conduzida com a distribuição de panfletos informativos sobre o projeto, bem como sobre a casuística dos tumores, salientando a prevenção e o diagnóstico

precoce das neoplasias mais prevalentes em animais de companhia. Além disso, com o objetivo de despertar a curiosidade e o interesse de parte das crianças eram utilizados modelos em pelúcia que mimetizam tumores de pele e de mama.

Para exposição do projeto foram confeccionados banners e cartazes explicativos, com o objetivo de atrair o público e divulgar a ação entre a população em geral. A equipe era identificada através do uso de camisetas e botons personalizados. Ainda, foram firmadas parcerias com outros grupos de pesquisa, ensino e extensão, o que permitiu maior alcance de divulgação.

Nos eventos , os tutores são alertados a evitar o uso de anticoncepcionais em cadelas, um dos principais responsáveis pela formação de neoplasmas de mama. Também, informamos sobre a importância da ovariohisterectomia precoce, procedimento que reduz a chance de neoplasia mamária para 0,5% quando realizada antes do primeiro estro (FONSECA et al., 2000). Assim como, para os neoplasmas de pele evitar a exposição excessiva ao sol, visto que a radiação ultravioleta é potencialmente oncogênica (MEIRELLES, et al., 2010).

Em relação aos materiais encaminhados ao SOVet entre 2016 a julho de 2020 foram contabilizadas 2.381 amostras para avaliação anatomopatológicas. Destes, 386 foram necropsias e 1.994 biópsias (Tabela 2).

TABELA 2. Materiais recebidos para diagnóstico anatomopatológico no período de março de 2016 e julho de 2020.

ANO	BIÓPSIA	NECROPSIA	TOTAL
2016	315	36	351
2017	466	94	560
2018	540	91	631
2019	547	142	690
07/2020	126	23	149
TOTAL	1.994	386	2.381

No transcorrer do período que o SOVet atua como projeto independente e contabiliza sua cauística, nota-se um aumento na procura pelo serviço de diagnóstico. Isso demonstra a importância das ações desenvolvidas pelo grupo, considerando que estas estimulam os tutores a buscar atendimento médico veterinário especializado, gerando um maior número de diagnósticos anatomopatológicos visando um melhor tratamento e prognóstico de seus pacientes oncológicos.

4. CONCLUSÕES

As ações de extensão têm se mostrado efetivas quando analisado o aumento na procura pelo serviço de diagnóstico anatomopatológico. As orientações dadas a população promovem um aumento na busca por serviços especializados, proporcionando diagnóstico precoce e melhor prognóstico de tratamento da patologia.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDIN, J.C.; FISCHER, I.C.C.; MORAES, J.; GIOPATO, G.; RAMALHO, M.F.P.; CONTIERI, M.B. Importância do estudo das neoplasias em medicina veterinária: Conceitos atuais. **Anuário da Produção de Iniciação Científica Discente,** São Paulo, 2005, 2v.

BENTUBO, H.D.L.; TOMAZ, M.A.; BONDAN, E.F.; LALLO, M.A. Expectativa de vida e causas de morte em cães na área metropolitana de São Paulo (Brasil). **Ciência Rural**, São Paulo, v.37, n.4, p.1021-1036, 2007.

FONSECA, C. S.; DELECK, C. R. Neoplasias mamarias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovario-histerectomia como terapia adjuvante. **Ciência Rural**, Santa Maria. v. 30, n.4, p.731-735, 2000.

HOFF, V.D.; CASTRO, C.C.; BERSELLI, M.; TILLMANN, M.T.; GUIM, T.N.; FERNANDES, C.G. Serviço de Oncologia Veterinária UFPel frente a comunidade. **IV Congresso de Extensão e Cultura UFPEL**, Pelotas. [*s. l.*], 2017.

HORTA, R.S.; LAVALLE, G.E. O câncer em pequenos animais. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, n.70, p.09-10, 2013.

MEIRELLES, A. E. W. B.; OLIVEIRA, E. C.; RODRIGUES, B. A.; COSTA, G. R.; SONNE, L.; TESSER, E. S.; DRIEMEIER, D. Prevalência de neoplasmas cutâneos em cães da Região Metropolitana de Porto Alegre, RS: 1.017 casos (2002-2007). **Pesquisa Veterinária Brasileira,** Porto Alegre. v.30, n.11, p.968-973, 2010.

PAOLONI, M.; KHANNA, C. Comparative Oncology Today. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice,** Bethesda, v.37, n.6, p.1023-1032, 2007.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

SERVIÇO DE ONCOLOGIA VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS – SOVET/UFPEL

ALINE DO AMARAL[1]; CLARISSA CAETANO DE CASTRO[2]; LUÍSA GRECCO CORRÊA[3]; LUÍSA MARIANO CERQUEIRA DA SILVA[4]; THOMAS NORMANTON GUIM[5]; CRISTINA GEVEHR FERNANDES[6]



Outubro Rosa Pet



2016 - 1º Pet Stop



2017 - Outubro Rosa Pet



2018 - 1ª Semana de Proteção Animal



2019 – Universidade na Rua



2020 - Conteúdo Online

Talk Science *At Home*: dos pubs para a internet

ANA CLAUDIA OLIVEIRA DE FREITAS[1]; TIFFANY THUROW BUNDE[2] IZADORA PETER FURTADO[3]; THAÍS LARRÉ OLIVEIRA[4;] MARIANA HÄRTER REMIÃO[5] PRISCILA MARQUES MOURA DE LEON[6]

[1]*Universidade Federal de Pelotas – anaclaudia.olvf@outlook.com*
[2]*Universidade Federal de Pelotas – tiffany_bia@hotmail.com*
[3]*Universidade de São Paulo – izapfurtado@gmail.com*
[4]*Universidade Federal de Pelotas – thais.larreoliveira@gmail.com*
[5]*Universidade Federal de Pelotas – mh.remiao@gmail.com*
[6]*Biotecnologia/CDTec/UFPel – primleon@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

O século XXI exibe avanços científicos sem precedentes, com inúmeros benefícios para a sociedade e, também, revela que a maior parte dos benefícios se concentra em uma pequena porcentagem da população, dessa forma é distribuída de uma forma brutalmente desigual e intrínseca (GERMANO 2007). A geração e aplicação de ferramentas contemporâneas para a popularização da ciência contribuem significativamente para as ações que provenham o conhecer, o refletir, o debater e a participação na socialização entre universidade-comunidade (BORGES, 2017).

O Talk Science é um evento, resultante de um projeto unificado com ênfase em ensino vinculado à Graduação em Biotecnologia (G-Biotec) do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) da UFPel, inspirado no *festival Pint of Science*, (PORTAL PINT OF SCIENCE, 2018). O Talk Science já teve outras edições, uma no ano de 2018 e outras duas no ano de 2019, abordando respectivamente internacionalização da ciência, CRISPR-CAS9 e biotecnologia na área da alimentação.

Devido ao momento de extrema complexidade que estamos vivendo, por conta da pandemia da COVID-19, o nosso local de atuação que antigamente eram bares e pubs da cidade de Pelotas/RS migrou temporariamente para a internet, utilizando o Instagram (*@talkscience_*) como principal meio de comunicação. Assim, a nova versão é denominada “Talk Science: *at home*” e continua com o mesmo objetivo de mostrar como a ciência pode ser interessante, inspiradora e impactante. O projeto é organizado por um grupo composto de alunos e professoras da G-Biotec, com a participação de colaboradores externos

de outras instituições de ensino, os quais juntos organizam conteúdos diversificados acerca da ciência para a comunidade em geral, com uma linguagem mais simplificada e um layout divertido. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi descrever as etapas de planejamento e organização de posts interativos para a o perfil no Instagram "*Talk Science: at home*" a fim de alcançar um público cada vez maior.

2. METODOLOGIA

Primeiramente, a fim de analisar e propor novas ideias, foram realizadas reuniões sistemáticas periódicas com o grupo discente e docentes, junto da professora coordenadora do projeto. Durante os encontros foram levantados estratégias e pontos essenciais para a criação e bom andamento do nosso projeto, adaptando-o ao formato remoto. Dessa forma, com o intuito de organizar o projeto foram discutidos os seguintes pontos: a rede social que seria veiculado o projeto, os quadros que seriam criados, a periodicidade das publicações, as ferramentas que seriam utilizadas e a criação de uma identidade visual para a nova edição "*at home*".

Em seguida, foi elaborado um sistema organizacional genérico para todos os quadros criados que consiste basicamente; na escolha do tema abordado, seguido da votação pelos membros da equipe 10 dias antes da publicação, criação da arte e do conteúdo sete dias antes da publicação e correção da publicação disponível até um dia antes da postagem.

Toda a arte utilizada nas publicações é feita utilizando o Canva (https://www.canva.com/). Cada quadro foi criado com uma coloração específica para melhor comunicação visual com os seguidores e, também, visando uma estética mais profissional do *feed*. Foram escolhidos oito diferentes quadros para o projeto, variando entre publicações no *feed,* nos *stories* e no IGTv. Porém, no presente trabalho apenas três quadros vão ser analisados, o "Você Sabia?", "Explicando" e "Vídeos no IGTv".

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o foco de levar a ciência para a casa de todos, atualmente o Instagram do Talk Science tem o total de 717 seguidores e 19 publicações. Antes do novo projeto tomar forma a página contava no início de março com 218 seguidores e apenas 4 publicações.

Mesmo com a maioria dos nossos seguidores sendo de Pelotas (40%), também alcançamos cidades de fora do estado como Goiânia (6%), São Paulo (2%) e Ribeirão Preto (2%) (Figura 1). Além disso, o público em uma grande maioria está entre a faixa etária de 18-24, apresentando um total de 57% dos nossos seguidores, conforme apresentado na figura 2.

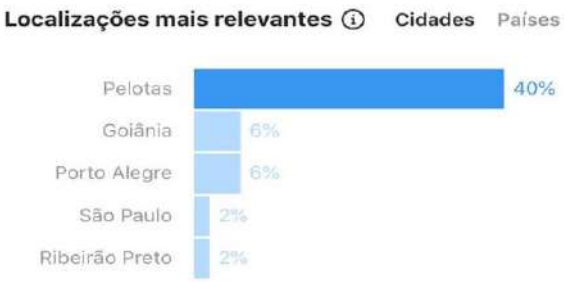


Figura 1. Gráfico das cidades nas quais habitam a maioria dos seguidores do perfil no Instagram @talksience_.



Figura 2. Gráfico da faixa etária dos seguidores do perfil no Instagram @talkscience_.

O post com maior acesso (1.207 visualizações, 89 compartilhamentos, 123 curtidas) é pertencente ao quadro de “Vídeos no IGTv” e tem como assunto principal a pesquisa contra a COVID-19 na UFPEL, apresentado pelo Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite. O principal motivo de tantos acessos se deu pela desenvoltura do apresentador em apresentar uma pesquisa interessante acerca do COVID-19.

O quadro “Você sabia?” conta com três publicações no feed intituladas: “Você sabia que existe um museu apenas sobre microrganismos?”; “Você sabia que existe uma cebola que não nos faz chorar?”; “Você sabia que a insulina foi o primeiro produto biotecnológico produzido com a tecnologia do DNA recombinante?”. Quando somadas, as três publicações contam com mais de 190 curtidas, evidenciando o aceite do nosso conteúdo diferenciado e interativo explicando curiosidades acerca da ciência.

Por fim, temos o quadro “Explicando” que foi gerado pela necessidade de aprofundar um pouco nos temas escolhidos no “Você Sabia?”. Atualmente duas publicações em série foram realizadas, o “Explicando os Microrganismos: parte 1” e “Explicando os Microrganismos: parte 2” as quais juntas somam um alcance de mais de 700 pessoas.

4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que os discentes envolvidos na organização do “Talk Science: at home” obtiveram imensa evolução na habilidade de comunicação, trabalho em equipe, cumprimento de prazos e principalmente em repassar conteúdo científico em uma linguagem acessível e correta para o público. Tendo em vista o crescimento do perfil *@talkscience_,* em poucos meses percebemos o interesse público em nosso conteúdo, o que nos motiva a estar sempre criando e desenvolvendo novos quadros e formas de entregar o nosso trabalho.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GERMANO, M.G; KULESKA, W. A. POPULARIZAÇÃO DA CIÊNCIA: UMA REVISÃO CONCEITUAL. **Academia Brasileira Ens Física**, Florianópolis, v. 24, n. 1, p. 7-25, 2007.

PINT OF SCIENCE. **About**. Acessado em 10 de setembro de 2019. Disponível em http://pintofscience.com/about/. CASTRO, I. C; A

BORGES, M. A; POPULARIZAÇÃO DA CIÊNCIA E DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA: EXTENSÃO; **Revista Congrea**, v. 1, n. 1 p.85-88 , 2017.

Reunião para escolha do conteúdo

Votação para o melhor conteúdo



Preparo da arte utilizando o canva

Canva

Revisão do conteúdo



Correção do conteúdo



720 seguidores

19 publicações

3.588 impressões

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA CLIVAGEM DE AMOSTRAS DE TECIDO CUTÂNEO

CAIO MAURÍCIO AMADO[1]; MARINA GIODA NORONHA[2]; ANDRESSA DUTRA PIOVESAN ROSSATO[3]; LUÍSA MARIANO CERQUEIRA DA SILVA[4]; CLARISSA CAETANO DE CASTRO[5]; CRISTINA GEVEHR FERNANDES[6]

[1]Universidade Federal de Pelotas – caiomauriciovet@gmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas – marinagnoronha1@gmail.com
[3]Universidade Federal de Pelotas – luisamarianovet@yahoo.com.br
[4]Universidade Federal de Pelotas - andressa-piovesan@hotmail.com
[5]Universidade Federal de Pelotas - clarissac.decastro@gmail.com
[6]Universidade Federal de Pelotas - crisgevf@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A Oncologia é uma área em expansão na medicina veterinária (MARTINS et al., 2011). Neste sentido, o Serviço de Oncologia Veterinário da Universidade Federal de Pelotas (SOVet/UFPel) foi criado com o propósito de suprir a crescente demanda por atendimento especializado em oncologia veterinária, prestando à comunidade atendimentos clínicos, cirúrgicos e diagnósticos anatomopatológicos, além de reunir ações de ensino, pesquisa e extensão (BERSELLI et al., 2018).

O diagnóstico anatomopatológico consiste na avaliação macroscópica e microscópica, sendo uma ferramenta indispensável para determinar a causa da morte do animal ou estabelecer o diagnóstico de lesões em biopsias incisionais e excisionais encaminhadas para análise do patologista (CARNEIRO et al., 2017).

Segundo NUNES; CINSA (2016) é extremamente importante compreender as etapas para a confecção das lâminas histológicas para que seja possível de fato, interpretá-las adequadamente. A técnica histológica é composta por uma série de etapas, sendo elas: coleta do material; fixação; clivagem; processamento; desidratação; clarificação; impregnação; inclusão; microtomia; coloração e montagem.

A clivagem é o processo de seleção e redução do tamanho do tecido, visando obter a melhor amostra da lesão observada, além facilitar as próximas etapas da técnica histológica (CAPUTO, et al., 2010; NUNES; CINSA, 2016).

A grade curricular do curso de medicina veterinária não disponibiliza o devido espaço para que seja feita uma abordagem aprofundada acerca destes assuntos com os discentes. Assim sendo, foram desenvolvidos tutoriais em formato de Procedimentos Operacionais Padrão (POPs) para repassar este conhecimento aos colaboradores do Grupo de Estudos Avançados em Oncologia Veterinária do SOVet, priorizando o ensino e qualificação dos discentes para atuação na área da patologia animal.

O objetivo deste trabalho, portanto, é apresentar o POP elaborado para a etapa de clivagem das amostras de lesões cutâneas encaminhadas ao SOVet para exame anatomopatológico.

2. METODOLOGIA

O passo a passo da avaliação macroscópica e das rotinas de clivagem foi exaustivamente exercitado em uma capela de exaustão e os procedimentos foram discutidos nas reuniões do grupo que integram o projeto de ensino. As reuniões eram semanais e contavam com a participação dos colaboradores da graduação, da pós-graduação e dos orientadores. A partir da construção desse conhecimento foi elaborado um POP, que contém as informações necessárias para a adequada descrição e clivagem, em procedimentos específicos para amostras de tecidos cutâneos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em um estudo retrospectivo sobre neoplasmas atendidos no Hospital de Clínicas Veterinárias da UFPel no período de 2013 a 2017, BARBOZA et al. (2019) relatam que os tumores cutâneos foram os mais frequentes, representando 40,84% de todos os neoplasmas em cães e gatos atendidos no período. Outro estudo, realizado por NORONHA et al. (2019), sobre a casuística do SOVet/UFPel no período de 2016 a 2018, demonstrou que 66,3% das amostras recebidas para análises anatomopatológicas eram de tumores cutâneos. Dessa forma, torna-se evidente a alta prevalência de lesões cutâneas nos animais domésticos e a necessidade de estar qualificado para trabalhar com este material nas diferentes etapas da técnica histológica.

De acordo com CORRÊA (2020), os POPs são os protocolos onde constam a descrição de como uma atividade específica deve ser realizada e todas as informações relacionadas a esta atividade, sendo o seu principal objetivo o efetivo gerenciamento nas organizações de trabalho, viabilizando que uma atividade seja realizada adequadamente e sempre da mesma forma por diferentes pessoas, de modo a garantir, com segurança e eficiência, a qualidade do serviço com o mínimo de erros possíveis.

O POP elaborado pelos integrantes do grupo de estudo foi desenvolvido com foco na avaliação macroscópica e no processo de clivagem dos materiais de tecidos cutâneos, após a coleta e fixação em formol. Logo, devem ser seguidos rigorosamente os seguintes passos: 1) Realizar a leitura e análise da requisição de exame encaminhada pelo clínico/cirurgião, bem como possíveis exames complementares (radiografia, ultrassonografia, citologia, entre outros); 2) Conferir se a o fragmento cutâneo recebido condiz com a descrição da ficha de requisição; 3) Realizar especificação do formato (navicular, peduncular, arredondado ou irregular); 4) Identificar se há presença de pelos (pele hirsuta, alopécica ou glabra); 5) Mensurar o tamanho do material em três dimensões (altura, largura e comprimento); 6) Quando necessário, realizar a pintura com tinta nanquim para posterior avaliação das margens cirúrgicas; 7) Identificar se o material apresenta úlceras e, se houver, mensurar o tamanho em três dimensões; 8) Realizar cortes seriados; 9) Descrever a consistência do tecido ao corte (macio, firme, elástico, duro, arenoso); 10) Descrever a coloração do tecido ao corte (esbranquiçado, amarelado, avermelhado, amarronzado, enegrecido, moteado ou outras) e ainda se esta é homogênea ou heterogênea; 11) Verificar

se ao corte o tecido apresenta alguma estrutura anormal como nódulos ou cistos; 11a) Se houver nódulo, mensurar o tamanho em três dimensões, descrever a consistência e a coloração; 11b) Se houver cistos, mensurar o tamanho em três dimensões e descrever a característica do conteúdo interno (gelatinoso, aquoso, purulento, enegrecido, avermelhado, etc). 12) Quaisquer alterações presentes que não constem neste POP devem ser descritas como observações.

Tal como outros POPs criados pelo grupo de estudo, este material foi produzido pensando na facilidade de acesso e entendimento pelos graduandos, pós-graduandos, professores e demais profissionais da medicina veterinária, ao passo que mantém a execução das corretas técnicas de coleta, acondicionamento, clivagem e processamento do material.

4. CONCLUSÕES

Através da elaboração e treinamento do POP para avaliação macroscópica e clivagem de tecidos cutâneos, foi possível repassar aos graduandos e pós-gradundando integrantes do grupo de estudo o conhecimento sobre um assunto específico que é pouco abordado nas disciplinas da grade curricular da faculdade de veterinária. Além disso, o material colabora para padronização e qualificação das atividades realizadas no SOVET, o que reflete diretamente no tratamento e na saúde do paciente que aguarda pelo resultado dos laudos anatomopatológicos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOZA, D.V.; GRALA, C.X.; SILVA, E.C.; SALAME, J.P.; BERNARDI, A.; SILVA, C.B.; GUIM, T.N. Estudo retrospectivo de neoplasmas em animais de companhia atendidos no hospital de clínicas veterinárias da universidade federal de Pelotas durante 2013 a 2017. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.13, n.4, p.1-12, 2019.

BERSELLI, M., TILLMANN, M.T., HOFF, V.D., CASTRO, C.C., ROSSATO, A.D.P., SILVA, L.M.C., GUIM, T.N., FERNANDES, C.G. Ações de prevenção do câncer em pequenos animais pelo Serviço de Oncologia Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (SOVET- UFPEL). **Expressa Extensão**, v.23, n.2, p.58-69, 2018.

CAPUTO, L.F.G.; GITIRANA, L.B.; MANSO, P.P.A. Técnicas histológicas. In: MOLINARO, E.M.; CAPUTO, L.F.G.; AMENDOEIRA, M.R.R. **Conceitos e Métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde - volume 2.** Rio de Janeiro: EPSJV/IOC, 2010. Cap.3, p.89-188.

CARNEIRO, C.; et al. Diagnóstico anatomopatológico em animais domésticos. In: **MOSTRA NACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA**

INTERDISCIPLINAR E III IFCULTURA, 10., Camboriú, 2017. **Anais...** Camboriú: Pró-reitoria de extensão, 2017.

CORRÊA, G.T.; ARCHER, A.B.; PEREIRA, G.K.; VIECILI, J. Uso de procedimentos operaracionais padrão (POPs) comportamentais na realização de atividades profissionais. **Revista psicologia: organizações & trabalho.** v.20, n.02, p.1011-1017, 2020.

MARTINS, D.B.; TEIXEIRA, L.V.; FRANÇA, R.T.; LOPES, S.T.A. Medvep - **Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v.9, n.31, p.630-637, 2011.

NORONHA, M.G.; AZEVEDO, P.B.; AMADO, C.M.; CORRÊA, L.G.; CASTRO, C.C.; FERNANDES, C.G. Comparação do grau de malignidade dos mastocitomas cutâneos de cães segundo Patnaik et al. (1984) e Kiupel et al. (2011). In: **SEMANA INTEGRADA DE INOVAÇÃO, ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO**, 5., Pelotas, 2019. **Anais do XXVIII Congresso de Iniciação Científica.** Pelotas: Pró-reitoria de pesquisa, pós-graduação e inovação, 2019.

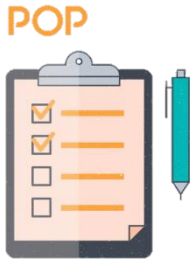
NUNES, C.S.; CINSA, L.A. Princípios do processamento histológico de rotina. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 8, p.31-40, 2016.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA CLIVAGEM DE AMOSTRAS DE TECIDO CUTÂNEO

CAIO MAURÍCIO AMADO[1]; MARINA GIODA NORONHA[2]; ANDRESSA DUTRA PIOVESAN ROSSATO[3]; LUÍSA MARIANO CERQUEIRA DA SILVA[4]; CLARISSA CAETANO DE CASTRO[5]; CRISTINA GEVEHR FERNANDES[6]





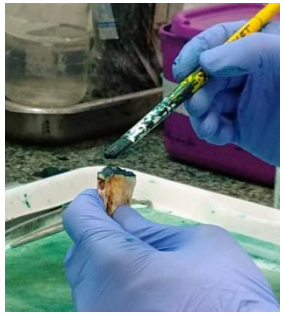
Criação de POP para lesões cutâneas



Conferir ficha clínica e material enviado



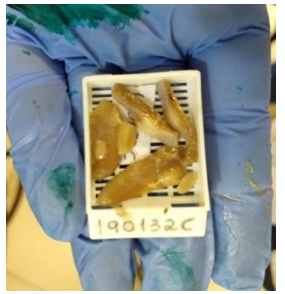
Avaliação da peça cirúrgica



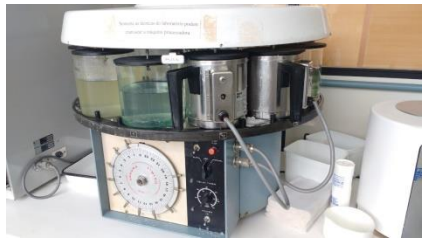
Pintura com tinta nanquim



Cortes seriados e avaliação ao corte



Inclusão em cassetes



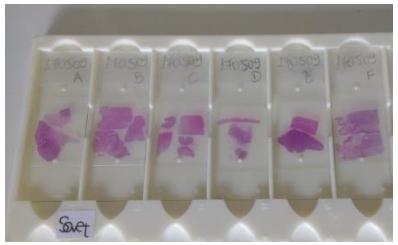
Histotécnico - processador automático de tecidos



Micrótomo



Coloração das lâminas pelo HE/Preparo das lâminas



Lâminas prontas para avaliação microscópica

MICROVERDES

DAVI BÄRWALDT DUTRA[1];LUCIANA BICCA DODE

[1]Universidade Federal De Pelotas – ddavibarwaldt@gmail.com
Universidade Federal De Pelotas–Lucianabicca@gmail.com

INTRODUÇÃO

Olericultura segundo Puiatti (2019) é a ciência que trata do ensino pesquisa e cultivo de espécies herbáceas usadas como alimento humano. O autor ainda aponta as diferentes formas de cultivo, objetivos e organização das hortas. De imediato, somo remetidos a reflexão que o ato de cultivar e não apenas coletar gerou um marco histórico capaz de impulsionar a organização econômica e social humana de forma progressiva.

Ao longo destes aproximados 10.000 anos, a agricultura evoluiu e mais recentemente, para atender a crescente pressão demográfica adotou tecnologias baseadas no uso intensivo do solo, adubos químicos e agrotóxicos e variedades melhoradas formando o pacote advindo da Revolução Verde (TRIVELLATO E FREITAS, 2003; MATOS, 2010). Tal modelo não tem aceitação plena na sociedade contemporânea pressionando o setor primário também para o aprimoramento e adoção de formas alternativas de cultivo. Assim, distintas estratégias que evocam a sustentabilidade de forma ampla e abrangente incluindo suas dimensões econômica, ecológica e social (CAPORAL E COSTABEBER, 2004) buscam garantir a almejada qualidade alimentar através da opção por alimentos integrais, com fibras, ricos em nutrientes e livres de agrotóxicos (DAROLT, 2003). Na pandemia, onde as pessoas passam maior parte do tempo em casa, a forma como usufruem de seu espaço e estabelecem novas prioridades de acordo com o tempo disponível, fomentam relações de prioridades de consumo e restabelecem elos com o meio ambiente . A prática e habito de cultivar hortas domesticas contribui para o desenvolvimento de atividades físicas, o estabelecimento de terapia ocupacional fortalecendo a cidadania a partir de um resgate cultural e da busca de sustentabilidade Ao possibilitar incorporar na alimentação fontes de alto valor nutritivo de forma segura, a prática contribui para a

segurança alimentar e ainda reforça valores sociais ambientais (ESTEVO et al , 2013 apud TERASSI, 2012).

A possibilidade de produção de alimentos orgânicos ou livres de agrotóxicos, propicia vivencias provendo o contato direto com todas etapas do processo produtivo (TERASSI et al ,2012). O cultivo de microverdes (microgreens) são vegetais de espécies já cultivadas, colhidos na presença de cotilédones e das primeiras folhas verdadeiras em curto período de tempo (em geral de 14 a 21 dias após a semeadura) (TREADWELL et al 2010).

METODOLOGIA

A equipe composta por alunos voluntários do cursos de Biotecnologia e Agronomia é coordenado Pela professora Luciana Bicca Dode (CDTec) e conta com a participação dos professores Ana Lucia Chaves (CCQFA) e Jerri Zanuso (FAEM). O desenvolvimento das atividades durante o período de pandemia acontece na modalidade remota através de reuniões sistemáticas, com periodicidade semanal, através do sistema webconf da UFPEL e atividades na modalidade homeoffice. Nas reuniões colegiadas, são discutidos e elaborados planejamentos semanais. A fim de manter a interação entre os participantes e troca de informações, o grupo utiliza o canal privado Micro_verdes Tec na rede social Telegram. No canal são sugeridas bibliografias sobre os cultivos, organizados materiais de divulgação e planejadas atividades.

Os resutados das pesquisas e atividades são compartilhados no Instragram @micro_verdes e na fã page do Facebook @hortamicro.

Ações em prol da comunidade menos favorecida são promovidas através de Microkits solidários, kits básicos para cultivo doméstico de microverdes que são trocados por leite em pó. Também são recolhidos alimentos para compor cestas básicas, em troca de. Recentemente, o projeto recebeu apoio da empresa Isla sementes que irá doar sementes para elaboração de microkits e produção de mudas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através do Instagram, foram realizadas 213 postagens no perfil conta com 320 seguidores, a maioria de Pelotas (67%) indicando que as estratégias utilizadas pela equipe tem motivado de forma eficaz a comunidade local. Também é interessante observar a faixa etária dos seguidores, a maioria jovens até 45 anos, predominantemente do sexo feminino. Com mais de 4.000 visualizações no período de 17 à 23 de julho o engajamento dos internautas é crescente, com mais de 80 interações semanais nas postagens, apontando o evidente o interesse dos seguidores no cultivo em casa de forma sustentável.

A extensão, mesmo no período de distanciamento social passa a ter um papel relevante reforçando a postura cidadã dos acadêmicos voluntários do projeto. A possibilidade de permanecer em contato com a comunidade através de ações on line passou a ser vetor importante para entrega de conteúdo técnico e científico, levando ao público resultados de pesquisa, fortalecendo os vínculos entre sociedade e universidade contribuindo para o bem estar físico e mental. A expectativa do projeto é abarcar cada vez mais internautas e pessoas que se interessem por um consumo consciente e sustentável viabilizando a produção de alimentos no espaço doméstico.

CONCLUSÕES

O cultivo doméstico de hortas e microverdes reforça na perspectiva da extensão o engajamento da Universidade de Federal de Pelotas na comunidade. Através de ações de ensino e extensão, Microverdes contribui para o compartilhamento de informações técnicas cientificamente embasadas e desperta para valores relacionados ao ambiente e a sustentabilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAPORAL, F.R., COSTABEBER, J.A., AGROECOLOGIA E EXTENSÃO RURAL Contribuições para a Promoção do Desenvolvimento Rural Sustentável, Porto Alegre, RS, 2004. Disponível em: http://www.emater.tche.br/site/arquivos_pdf/teses/agroecologia%20e%20extens

ao%20rural%20contribuicoes%20para%20a%20promocao%20de%20desenvolvimento%20rural%20sustentavel.pdf. Acesso em: 21/07/2020.

DAROLT, M. Comparação entre a qualidade do alimento orgânico e a do convencional Panorama da Agricultura Orgânica. In: STRINGUETA PC; MUNIZ JN. **Alimentos orgânicos**: Produção tecnologia e Certificação, Viçosa:UFV, 2003.452p.

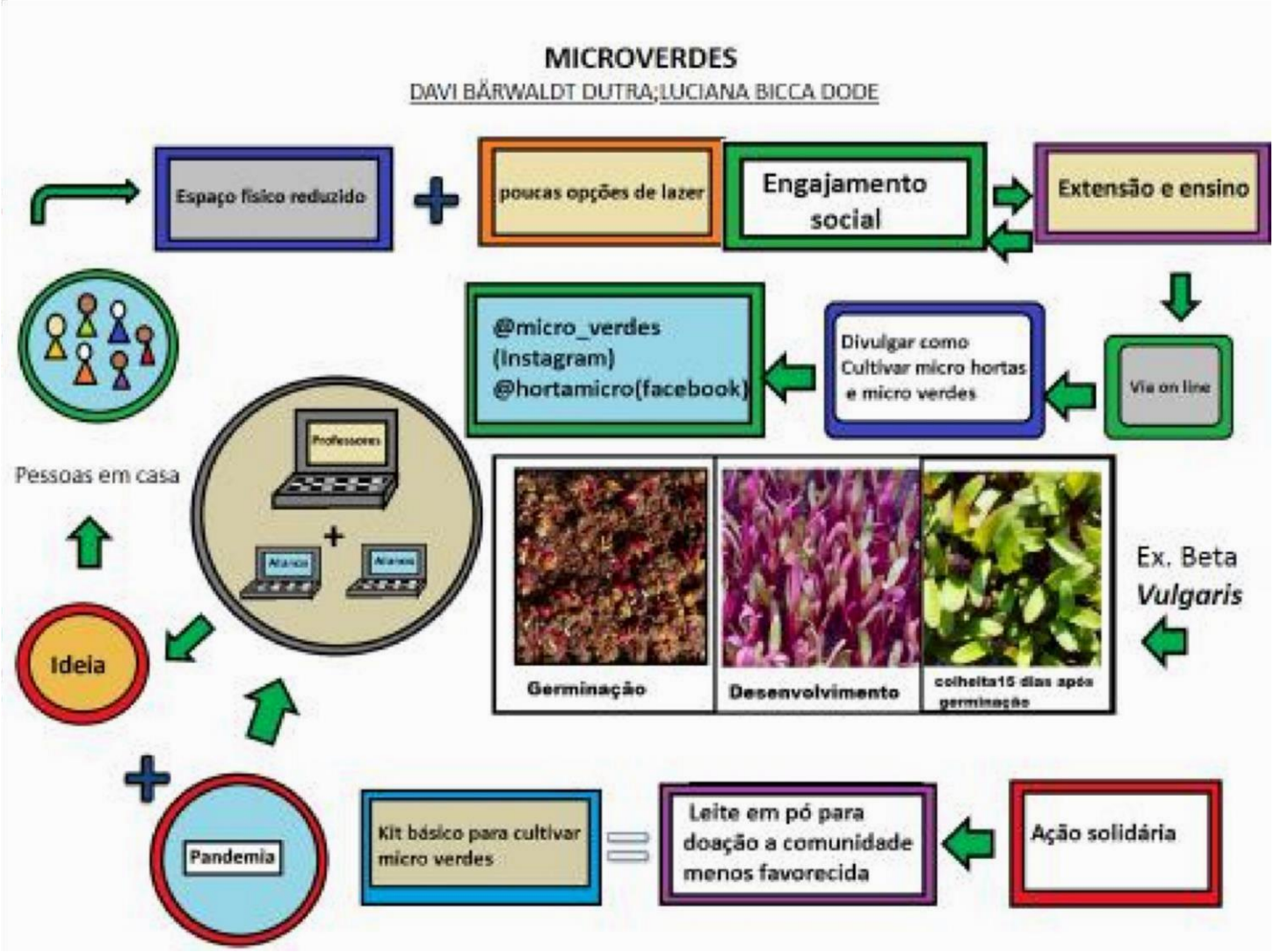
ESTEVO, E. ; BARBOSA, B.N.; OLIVEIRA**,** Q.N.C.C.; Hortaliças cultivadas em horta doméstica: prática alternativa para promoção da saúde**. In:** Anais 12°congresso Brasileiro de medicina de família e comunidade ,Belem/Pará 29 de maio a 02 de jun 2013.
MATOS, A.K.V., Revolução verde, biotecnologia e tecnologias alternativas. Cadernos da FUCAMP, v.10, n.12, p.1-17, 2010.

PUIATTTI, M. A arte de cultivar hortaliças , Viçosa, MG : UFV, CEAD, 2019.
Livro eletrônico .ISSN 2179-1732; n. 40. Disponível em:
https://www2.cead.ufv.br/serieconhecimento/wpcontent/uploads/2020/03/Olericultura-download.pdf**.** Acesso em 20/07/2020.

TESSARI, J.; SANTOS **,**S.A**.; Horta Doméstica para apartamento**. Anteprojeto de Trabalho de Conclusão de Curso (Design)- Departamento de Design, Univille. Joinville, Santa Catarina, 124p. 2012.

TREADWELL, D. D.; HOCHMUTH ,R. ; LANDRUM,L. ;LAUGHLIN ,W.;
Microgreens: A New Specialty Crop. UF/IFAS, Extension, 2010. Disponível em: http://edis.ifas.ufl.edu. Acesso em 22/07/2020.

TRIVELLATO,M.D; FREITAS,G.B. Panorama da Agricultura Orgânica. *In*: STRINGUETA,P.C.; MUNIZ, J.N. **Alimentos orgânicos**: Produção tecnologia e Certificação, Viçosa:UFV, 2003.452p.


MICROVERDES
DAVI BÄRWALDT DUTRA;LUCIANA BICCA DODE
Espaço físico reduzido
poucas opções de lazer
Engajamento social
Extensão e ensino
Via on line
Divulgar como Cultivar micro hortas e micro verdes
@micro_verdes (Instagram) @hortamicro(facebook)
Professores
Alunos
Alunos
Pessoas em casa
Ideia
Pandemia
Germinação
Desenvolvimento
colheita15 dias após germinação
Ex. Beta Vulgaris
Kit básico para cultivar micro verdes
Leite em pó para doação a comunidade menos favorecida
Ação solidária

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA CLIVAGEM DE TUMORES MAMÁRIOS

MARINA GIODA NORONHA[1]; CAIO MAURÍCIO AMADO[2]; BÁRBARA SIQUEIRA DE JESUS[3]; ALINE DO AMARAL[4];LUÍSA GRECCO CORRÊA[5]; CRISTINA GEVEHR FERNANDES[6]

[1]Universidade Federal de Pelotas – marinagnoronha1@gmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas – caiomauriciovet@gmail.com
[3]Universidade Federal de Pelotas – bsiqueira05@hotmail.com
[4]Universidade Federal de Pelotas – amaralaaline@gmail.com
[5]Universidade Federal de Pelotas – luisagcorrea@gmail.com
[6]Universidade Federal de Pelotas – crisgevf@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O projeto Serviço de Oncologia Veterinário (SOVet), desenvolvido na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) é dividido em duas áreas, o SOVet clínica com atendimento no Hospital Veterinário e o SOVet patologia localizado no Departamento de Patologia Veterinária. O SOVet patologia foi criado no ano de 2016, juntamente com o projeto de ensino denominado Grupo de Estudos Avançados em Oncologia Veterinária. O SOVet presta serviço de diagnóstico anatomopatológico, no qual são realizadas necropsias de animais e avaliações de biopsias incisionais ou excisionais.

Sabe-se que há uma grande diferença entre a análise macroscópica e clivagem de uma peça cirúrgica. A macroscopia é a avaliação do material inteiro, como: medida (C x L x A), formato, coloração, presença de pelo, de úlcera e/ou de nódulos. A clivagem consiste na seleção, secção de fragmentos e amostragem dos tecidos para a microscopia (MOLINARO et al., 2010).

Dentre as amostras recebidas pelo SOVet, os tumores mamários de fêmeas caninas estão entre as peças cirúrgicas de maior demanda. BARBOZA et al. (2019) citam que as fêmeas da espécie canina possuem maior prevalência de neoplasias quando comparadas com os machos da mesma espécie e com os gatos de ambos os sexos. Ainda, relataram que os tumores mamários foram a segunda maior procura dos tutores por atendimento para seus animais, perdendo apenas para os tumores cutâneos.

Com o aumento da demanda dos serviços prestados pelo SOVet, sentiu-se a necessidade da elaboração de Procedimento Operacional Padrão (POP) para clivagem das peças cirúrgicas. Dessa forma, devido a importância do exame anatomopatológico para o diagnóstico do paciente, e para um resultado mais fidedigno, foi desenvolvido pelo Grupo de Estudos Avançados em oncologia Veterinária um POP para clivagem de tumores mamários.

2. METODOLOGIA

Como protocolo, para qualquer material encaminhado ao SOVet, primeiramente, é feita a verificação da identificação do material com a identificação do formulário encaminhado. Após, é observado a solicitação do

veterinário responsável e as demais informações preenchidas. Posteriormente, o material recebe outra identificação do SOVet (IDXXXXXX) para melhor compreensão da equipe.

A criação do POP compreendeu a descrição de toas as etapas da macroscopia e da clivagem dos tumores mamários que foram realizadas em capela de exaustão. Além disso, foram realizadas reuniões semanais pelo grupo visando à elaboração do POP para clivagem de tumores mamários. Nessas reuniões estavam presentes alunos da graduação, pós-graduação e professores.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

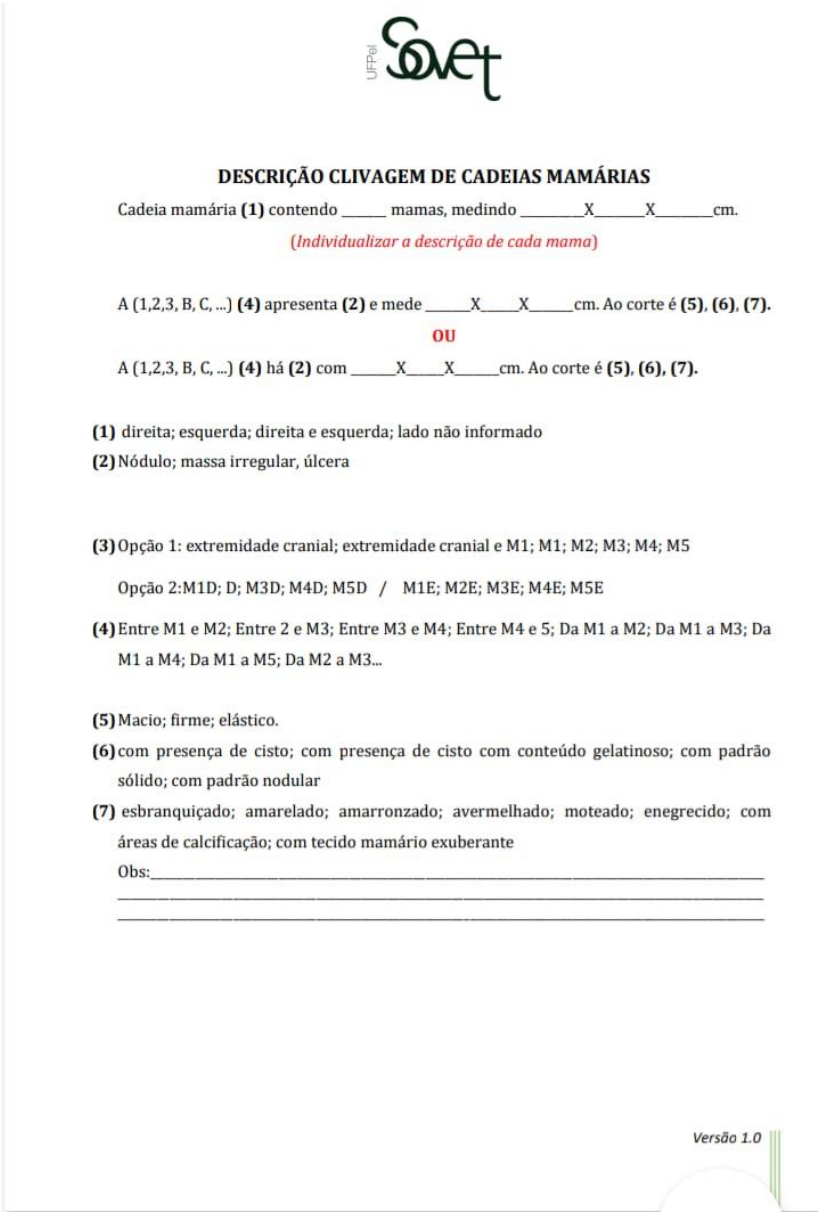
Os POPs são instruções detalhadas descritas para alcançar a uniformidade na execução de uma função específica. São importantes para um melhor preparo na condução de estudos clínicos, harmonização dos processos em pesquisa, treinamentos, profissionalismo, credibilidade e garantia da qualidade (BARBOSA et al., 2011). A elaboração do POP para clivagem de tumores mamários (Figura 1) permitiu uma melhor descrição das peças cirúrgicas auxiliando o patologista no diagnóstico de cada alteração observada.

As etapas foram padronizadas minunciosamente desde a análise macroscópica da cadeia mamária, como: identificação da cadeia mamária (esquerda ou direita), medição, contagem das mamas e pintura das margens cirúrgicas com tinta nanquim. A pintura das margens permite que fiquem evidenciadas na lâmina histológica, sendo possível verificar se restou células neoplásicas nas margens ou próximas a ela. Caso isso aconteça, as margens cirúrgicas são ditas comprometidas e, provavelmente, tenham restado células neoplásicas no paciente.

A próxima etapa é a, a clivagem da cadeia mamária e consiste na busca por alterações no interior do tecido, como nódulos e tecido mamário exuberante. Para isto são feitos cortes seriados e verticais em cima de cada mama e por toda extensão da cadeia mamária. Com isso, a descrição fica mais clara e a mesma tem como objetivo representar as áreas de interesse a serem estudadas. Essa metodologia da clivagem das cadeias mamárias foi proposta por CASSALI et al. (2014), visto que as neoplasias mamárias apresentam tipos histológicos múltiplos, podendo acometer mais de uma glândula de forma simultânea gerando mais de um diagnóstico e prognóstico (BENJAMIN, 1999).

Ainda, é realizada a clivagem dos linfonodos axilares e/ou inguinais quando encaminhados concomitante à cadeia mamária. Todo material clivado é acondicionado em cassetes histológicos identificados e encaminhados para o processamento histoquímico e, por fim será feita a confecção das lâminas histológicas para serem avaliadas em microscopia de luz.

Observou-se que com a utilização deste POP as descrições foram aperfeiçoadas e otimizadas, pois todas as informações necessárias estavam contidas nele. Dessa forma, entende-se a necessidade da criação do POP para a macroscopia e clivagem da cadeia mamária, possibilitando assim, diagnósticos de exames anatomopatológicos ainda mais qualificados.



UFPel SOVet

DESCRIÇÃO CLIVAGEM DE CADEIAS MAMÁRIAS

Cadeia mamária **(1)** contendo _____ mamas, medindo _____X_____X_____cm.

(*Individualizar a descrição de cada mama*)

A (1,2,3, B, C, ...) **(4)** apresenta **(2)** e mede _____X_____X_____cm. Ao corte é **(5)**, **(6)**, **(7).**

OU

A (1,2,3, B, C, ...) **(4)** há **(2)** com _____X_____X_____cm. Ao corte é **(5)**, **(6)**, **(7).**

(1) direita; esquerda; direita e esquerda; lado não informado

(2) Nódulo; massa irregular, úlcera

(3) Opção 1: extremidade cranial; extremidade cranial e M1; M1; M2; M3; M4; M5

Opção 2:M1D; D; M3D; M4D; M5D / M1E; M2E; M3E; M4E; M5E

(4) Entre M1 e M2; Entre 2 e M3; Entre M3 e M4; Entre M4 e 5; Da M1 a M2; Da M1 a M3; Da M1 a M4; Da M1 a M5; Da M2 a M3...

(5) Macio; firme; elástico.

(6) com presença de cisto; com presença de cisto com conteúdo gelatinoso; com padrão sólido; com padrão nodular

(7) esbranquiçado; amarelado; amarronzado; avermelhado; moteado; enegrecido; com áreas de calcificação; com tecido mamário exuberante

Obs:_____

_____

_____

Versão 1.0

Figura 1: POP de clivagem de tumores mamários elaborado pelo Grupo de Estudos Avançados em oncologia Veterinária/SOVet-UFPel.

4. CONCLUSÕES

Os procedimentos operacionais padrão (POPs) permitem a otimização, padronização, qualificação da descrição macroscópica e da clivagem de tumores mamários, garantindo assim uma amostragem fidedigna da peça encaminhada para exame anatomopatológico com diagnóstico condizente com a realidade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, C.M.; MAURO, M.F.Z.; CRISTOVÃO, C.A.B.C.; MANGIONE, J.A. A importância dos procedimentos operacionais padrão (POPs) para os centros de pesquisa clínica. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.57, n.2, p.134-135, 2011.

BARBOZA, D.V.; GRALA, C.X.; SILVA, E.C.; SALAME, J.P.; BERNARDI, A.; SILVA, C.B.; GUIM, T.N. Estudo retrospectivo de neoplasmas em animais de companhia atendidos no hospital de clínicas veterinárias da universidade federal de Pelotas durante 2013 a 2017, **PUBVET**, v.13, n.4, p.1-12, 2019.

BENJAMIN, S.A.; LEE A.C.; SAUNDERS, W.J. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles**. Veterinary Pathology,** v.36, n.5, p.423-436, 1990.

CASSALI, G.F.; et al. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary tumors, 2013. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.7, n.2, p.38-69, 2014.

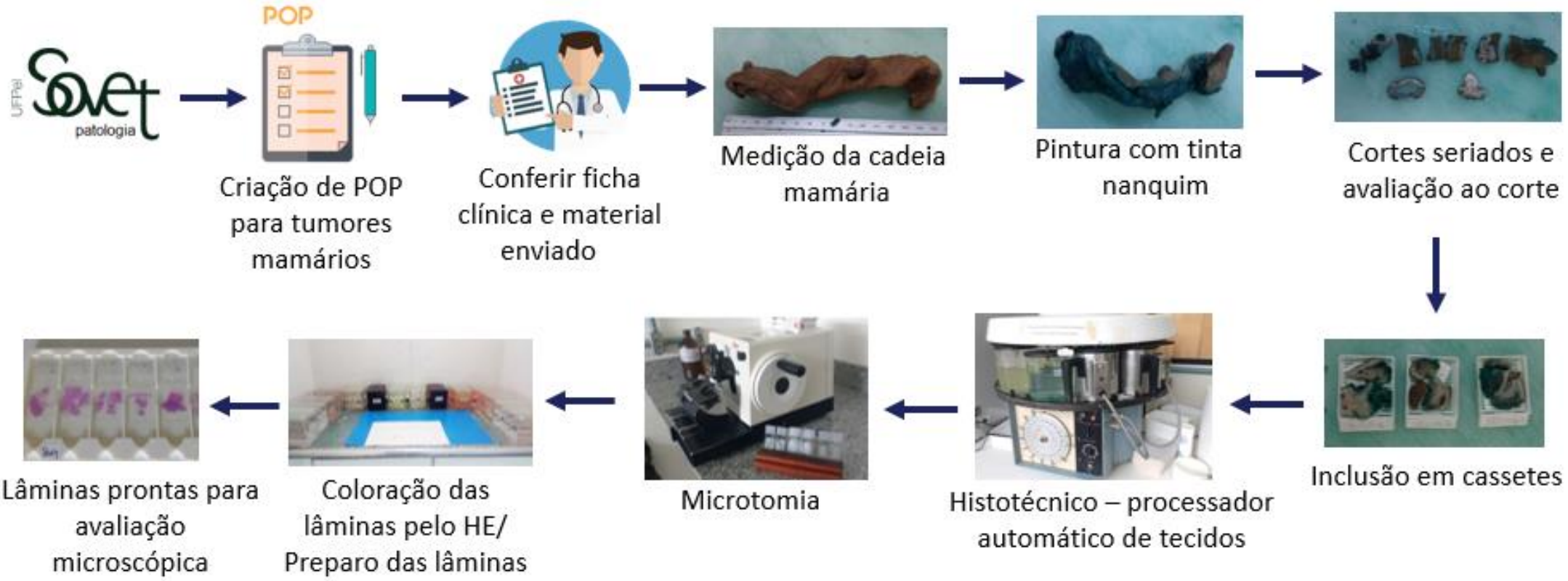
MOLINARO, E.M.; CAPUTO, L.F.G.; AMENDOEIRA, M.R.R. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV, 2010. 2v.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA CLIVAGEM DE TUMORES MAMÁRIOS

MARINA GIODA NORONHA[1]; CAIO MAURÍCIO AMADO[2]; BÁRBARA SIQUEIRA DE JESUS[3]; ALINE DO AMARAL[4];LUÍSA GRECCO CORRÊA[5];

CRISTINA GEVEHR FERNANDES[6]



DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA E SUA IMPORTÂNCIA: UMA BREVE REVISÃO.

Thayanne Thyssyanne de Souza Soares Costa[1]; Letícia Costa dos Santos[2];

[1]Universidade Federal Rural do Semi-Árido – oncolthayanne@gmail.com
[2]Universidade Federal Rural do Semi-Árido– lettycosta11@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A seguinte revisão bibliográfica busca lhes apresentar a divulgação científica, bem como compreende-la de uma melhor forma, na qual, entende-se como um conjunto de atividades com objetivo de fazer uma difusão do conhecimento científico, para públicos alvos que não são especializados com a temática, transmitindo aprendizado da ciência para a sociedade, baseando-se nos processos de interação e comunicação, tendo como um dos seus propósitos a contribuição social, dispondo-se de um papel imprescindível de aprendizagem nos indivíduos, ocasionando uma melhor percepção e conhecimento de assuntos científicos. Sendo a propagação da ciência por comunicação uma grande aliada nos avanços das pesquisas. De modo, que é através dessa disseminação que as pesquisas e a ciência ganham destaque.

Para (BUENO 1985) em sua publicação em Ciência e Cultura, a divulgação científica tem um papel de importante relevância para a sociedade, uma vez que, ela transpõe de um dialeto especializado para uma linguagem não especializada, possibilitando ao público que não é proficiente uma melhor compreensão. Bueno ainda afirma em sua publicação que a divulgação científica não está restrita ao campo da imprensa, todavia pode estar também integrada em revistas, jornais, livros didáticos, nas aulas, em histórias em quadrinhos e documentários por exemplo.

Para (MENDONÇA 2010) ‘’uma educação científica que possibilite aos cidadãos um reconhecimento da ciência como parte integrante da cultura humana passa a ser um objetivo social prioritário’’. A divulgação da ciência é um direito do social, de modo que ela precisa saber e entender um pouco mais de assuntos científicos, transformando-se em uma sociedade mais crítica e atuante.

A divulgação científica adquiriu dimensões maiores com os avanços tecnológicos através das mídias sociais, entretanto, apesar desses avanços temáticos científicas ainda são desconhecidas por boa parte dos indivíduos, principalmente, entre aquelas que não tem acesso a informação. Outrossim, é preciso de incentivo e investimento na propagação da ciência por diversos meios, democratizando o acesso a informação, incorporando a contribuição

para a educação científica servindo posteriormente como inspiração para novos pesquisadores.

(VALÉRIO 2005) apresentou em seu trabalho que a disseminação da ciência através da divulgação científica se dá por iniciativas em instituições públicas, como a (SBPC) Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, mostrando a importância de investimento em centros e museus científicos.

É notório a existência de algumas abordagens que podem fazer com que a ciência seja democratizada e disseminada. Para (VOGT 2011) ‘’Os eventos, como as feiras, os museus, os prêmios e as premiações, e os textos, as revistas, os jornais, enfim, a divulgação da ciência de uma forma geral, apresenta um papel de motivação e de mobilização da sociedade para o amor da ciência e do conhecimento, nos constituindo, não necessariamente como profissionais, mas como amadores da ciência, e têm em comum a característica de, na espiral da cultura científica, se situarem no terceiro e no quarto quadrantes, os do ensino para a ciência e o da divulgação científica, embora, na verdade, se distribuam por todos eles’’.

2. METODOLOGIA

A Análise feita a respeito do tema, tem como fundamentação pesquisa em publicações científicas como a (VOGT 2011), estudos a respeito do que é Divulgação Científica e como fazer, realizados através da plataforma virtual da Fundação Oswaldo Cruz acessada em 20 jun 2020. Foi retomado explicações de (MENDONÇA 2010) em apresentação da série Salto para o Furto, que leva como abordagem de tema divulgação científica e educação. Para uma melhor compreensão foi realizado uma revisão bibliográfica na plataforma Scielo.org. Ademais, a tese de doutorado de (VALÉRIO 2005), que mostra periódicos científicos eletrônicos e novas perspectivas de comunicação e divulgação para a ciência, foi usada para fortalecendo os conhecimentos da importância de se fazer presente a divulgação da ciência. E para uma melhor compreensão foi analisado as ideias de (BUENO 1985) em sua publicação em Ciência e Cultura.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com as informações obtidas diante das pesquisas de revisões bibliográficas feitas com enfoque na Divulgação Científica, foi possível observar que essa abordagem deve ganhar destaque na sociedade, sendo usada como uma ponte entre o mundo da ciência e a comunidade. Foi notório evidenciar que em virtude das grandes formas de disseminação da temática proposta, tal divulgação não está restrita apenas aos livros ou a revista científica, contudo, assumindo-se em diversas opções dinâmicas como as histórias em quadrinho, as conversas e inúmeros meios midiáticos presentes atualmente. De modo

que, qualquer pessoa que tenha interesse pelo assunto e conhecimento pode tornar-se um divulgador e disseminador da ciência. Devemos ressaltar também que a comunicação e um modo de evidenciar a percepção da ciência entre o público e consequentemente trazer mais benefícios para as pesquisas e destaque para o meio científico.

4. CONCLUSÕES

Em virtude dos fatos apresentados, juntamente com as pesquisas e os resultados notados no decorrer de tal estudo, foi possível ter uma perspectiva do futuro, no qual, através da divulgação dos conhecimentos dissipados e por todos esses aspectos, possamos ter uma sociedade com melhor percepção da ciência, tornando-se mais atuante, tendo potencial de ter embasamento suficiente para criticar e compreender o que antes era restrito a apenas um pequeno grupo. Promovendo um público com decisões informadas e mais democrático. Assim, podendo a sociedade incorporar mais conhecimento e a ciência avançar para novos níveis.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUENO, W. C. Jornalismo científico: conceitos e funções. **Ciência e Cultura**, São Paulo: SBPC, v. 37, p. 1420-1427. 1995.

VALERIO, P. M. C. M. **Periódicos científicos eletrônicos e novas perspectivas de comunicação e divulgação para a ciência**. 2005. Tese (Doutorado em Ciência da Informação). CNPq/IBICIT-ECO/UFRJ.

MENDONÇA, Rosa Helena. Divulgação científica e educação: apresentação da série. **Salto para o Futuro.** Divulgação Científica e Educação, ano XX, boletim 01, p. 3-4. 2010. Acessado em 22 jul. 2020. Online. Disponível em: https://cdnbi.tvescola.org.br/contents/document/publicationsSeries/175210Divulgacaocientificaeeducacao.pdf

SCIELO. Biblioteca Eletrônica Científica Online. Acessada em 02 de jul 2020. Online. Disponível em: https://scielo.org/

FIOCRUZ. Plataforma virtual. Acessada em 10 de jul 2020. Online. Disponível em: https://campusvirtual.fiocruz.br/portal/

UFBA. Diálogos entre ciência e divulgação científica. 2011. Acessado em 20 jul. 2020. Disponível em: http://repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/5946

VOGT, C. De ciências, divulgação, futebol e bem-estar cultural. **Diálogos entre ciência e divulgação científica (Leituras Complementares)**. Ano 2011. P 8-18. Acessado em 25 jul. 2020. Online Disponível em: http://repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/5946

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA

Saúde única

IV MOSTRA ACADÊMICA

DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA E SUA IMPORTÂNCIA: UMA BREVE REVISÃO.

Thayanne Thyssyanne de Souza Soares Costa[1], Letícia Costa dos Santos [2]

O que é ?



Popularização da ciência.



Tem papel importante na sociedade .



Mudança de uma linguagem especializada para uma não especializada.



Conectar ciência e pessoas.

Democratizar o acesso ao conhecimento científico.





Mostrar os avanços da ciência.



Uma sociedade mais crítica e atuante.

Referências

SCIELO. Biblioteca Eletrônica Científica. Online. Disponível em: https://scielo.org/

FIOCRUZ. Plataforma virtual. Online. Disponível em: https://campusvirtual.fiocruz.br/portal/

MEDICINA VETERINÁRIA E BIOTÉRIOS: INDISPENSÁVEIS À CIÊNCIA

WELLINGTON DA SILVA[1]; LETÍCIA DEAVANTIER KRÜGER[2]; TAÍS DA SILVA TEIXEIRA RECH[3] CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO[4]

[1]*Universidade Federal de Pelotas – wellingtondasilva.ws@gmail.com 1*
[2]*Universidade Federal de Pelotas* – leticiadevantier@hotmail.com *2*
[3] *Universidade Federal de Pelotas – taisteixeira.r@gmail.com 3*
[4]*Universidade Federal de Pelotas* – cbortolatto@gmail.com 4

1. INTRODUÇÃO

O uso de animais em experimentos científicos é indispensável para o prosseguimento de inúmeros estudos, sendo oportuno citar, como exemplo, as pesquisas que visam desenvolver uma vacina contra o agente causador da Covid-19. Na Grécia Antiga, a experimentação animal já era utilizada como fonte de conhecimento a respeito do funcionamento do corpo humano (FAPESP, 2008).

Tais animais precisam ser alocados, evidentemente, em um espaço que lhes garanta o bem-estar, desde o início de suas vidas até a morte. Para denominar tal local, cunhou-se o termo biotério. O mesmo pode ser dividido quanto à finalidade, *status* sanitário ou carga genética dos animais (ANDRADE et al, 2002). No Brasil, desde 2017, a responsabilidade técnica dos biotérios passou a ser privativa do médico veterinário (CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERÍNÁRIA, 2017).

Tendo em vista a grande importância dos biotérios para a ciência, o trabalho se propõe a elencar conceitos, classificações e o cotidiano dos mesmos, bem como apresentar o Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Também busca relacionar a profissão de médico veterinário com o assunto.

2. METODOLOGIA

A revisão bibliográfica se fundamenta em leituras realizadas em livros, revistas e sites que abordem o assunto. Além disso, foi realizada uma entrevista com a médica veterinária Anelize de Oliveira Campello Felix, responsável técnica pelo Biotério Central da UFPEL.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

CONCEITUANDO BIOTÉRIO E ELENCANDO SUAS CLASSIFICAÇÕES

Segundo a médica veterinária responsável pelo Biotério Central Da UFPEL, doutora Anelize de Oliveira Campello Felix, qualquer estabelecimento que mantém animais por mais de 12 (doze) horas com a finalidade de ensino/pesquisa é considerado um biotério. Para ANDRADE et al, 2002, o termo define um espaço onde animais destinados à experimentação são

criados e/ou mantidos, proporcionando-lhes saúde e bem-estar, permitindo a reprodução e desenvolvimento dos mesmos. Os biotérios podem ser divididos em subtipos:

- **quanto à finalidade a que se destinam**: biotério de criação, biotério de experimentação ou biotério de manutenção (CARDOSO, 2002);
- **condições sanitárias**: animais gnotobióticos, Animais Livres de Germes Patogênicos Específicos e animais convencionais (COUTO, 2002);
- **carga genética dos animais**: animais não-consanguíneos (*outbred*) e animais consanguíneos (*inbred*) (SANTOS, 2002)

APRESENTANDO O BIOTÉRIO DA UFPEL

O ambiente foi criado em 1980, pelo Departamento de Fisiologia e Farmacologia, do Instituto de Biologia. Primeiramente, foi direcionado a suprir as necessidades desse departamento. Contudo, passou a fornecer os animais a outras unidades, tendo em vista o aumento no número de pesquisas que precisavam desses modelos. Em 1991, a unidade passa a fazer parte do Gabinete do Reitor e, antes de 2017, também foi de responsabilidade da Faculdade de Medicina Veterinária. Atualmente, o mesmo está sob administração da Vice-Reitoria da UFPEL.

Contemplando mais de 40 projetos por ano, o Biotério atende as demandas de diversas unidades da Universidade. Nele, há a criação de Hamster Sírio (*Mesocricetus auratus*), Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) e Fischer, além de camundongos (*Mus musculus*) Swiss, C57BL6 e Balb/c.

COTIDIANO DE UM BIOTÉRIO

A depender de suas classificações, cada biotério apresenta certas particularidades, o que implica na roupa dos funcionários, hábitos de higiene, regras para isolamento (quando existente), além da alimentação dos animais e seus alojamentos. Também é importante manter um ambiente estável que não interfira na saúde e comportamento dos mesmos.

As vestimentas são importantes para evitar a contaminação dos animais, bem como proteger quem irá manipulá-los. Dependo do *status* sanitário de cada animal criado e a finalidade do experimento, haverá uma diferença. Uma barreira sanitária rigorosa conta com touca, luvas, máscara, macacão e propés. Geralmente há autoclavação da roupa. Já em biotérios com um menor controle sanitário, somente jalecos, luvas e propés são necessários, como orientado no site do Biotério Central da UFPEL. Também deve-se ter cuidado em relação a odores fortes, como o de perfumes.

A alimentação dos roedores é realizada através de ração peletizada, autoclavada e com componentes nutricionais a serem definidos pelo médico veterinário. Já a hidratação é realizada através de mamadeiras (bebedouros). Para alojar os animais, utiliza-se caixas com o fundo coberto por maravalhas esterilizadas, de preferência, e com a parte superior coberta por grade.

A temperatura do ambiente deve ser mantida em 21°C (±3). A umidade relativa do ar não pode ultrapassar 70% e nem ficar abaixo de 40%. A intensidade luminosa deve ser baixa e é importantíssimo manter-se o máximo de silêncio (REIS; FRANCO, 2012).

MEDICINA VETERINÁRIA E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Segundo a Resolução 1.178, de 17 de outubro de 2017, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, CFMV, a responsabilidade técnica de um biotério é privativa do médico veterinário. Para isso, o Conselho levou em consideração, dentre outros argumentos, o fato da Medicina Veterinária ter como função a garantia do bem-estar animal, algo previsto no Código de Ética do Médico Veterinário (CFMV, 2016).

Dentre as inúmeras atribuições introduzidas pela resolução citada, destaca-se a necessidade de conhecimento a respeito da área de animais de laboratório, bem como constantes atualizações quanto à legislação vigente sobre experimentação animal nos diversos órgãos. Contudo, a falta componentes curriculares que abordem o assunto prejudica muito a formação dos profissionais, como citado pela Médica Veterinária Responsável Técnica do Biotério Central da UFPEL. Segundo a doutora Anelize, é necessário ainda procurar algum programa de pós-graduação para uma qualificação, além de haver uma intensa troca de conhecimento com pessoas que detêm notório saber sobre o tema.

4. CONCLUSÕES

Evidencia-se que os biotérios constituem a base da experimentação animal, a qual depende da presença de um médico veterinario capacitado para manter o nível de excelência e o bem-estar dos animais. Contudo, o curso de Medicina Veterinária da UFPEL não dispõe de componentes curriculares para tal capacitação. Logo, o trabalho inova ao demonstrar a relação Medicina Veterinária/ biotério, ao mesmo tempo que expõe uma fragilidade na formação de tal profissional (médico veterinário) sobre o tema.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Livro

ANDRADE, A et al. **Animais de laboratório: Criação e experimentação.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002.

REIS, Sonia Rolim; FRANCO, Antonia Maria Ramos. **Manual básico de bioterismo**. Manaus: Inpa, 2012.

Capítulo de livro

CARDOSO, C. V. P. Classificação de Biotérios quanto a finalidade. *In:* ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de laboratório: criação e experimentação.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. Cap. 4, p. 29-32.

COUTO, S. E. R. Classificação de Animais de Laboratório quanto ao *status* sanitário. *In:* ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais**

de laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. Cap. 8, p. 59-64.

SANTOS, B. F. Classificação de Animais de Laboratório quanto ao *status* Genético. *In:* ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de laboratório: criação e experimentação.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. Cap. 9, p. 65-70.

Documentos eletrônicos

BIOTÉRIO Central. Disponível em: <https://wp.ufpel.edu.br/bioterio/>. Acesso em: 25 ago. 2019

CONSELHO FEFERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. Aprova o Código de Ética do Médico Veterinário. **Resolução Nº 1138**, de 16 de dezembro de 2016.

CONSELHO FEFERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. Dispõe sobre a responsabilidade técnica em estabelecimentos que criem ou utilizem animais em atividades de pesquisa ou ensino. **Resolução N° 1.178**, de 17 de outubro de 2017.

FAPESP. **Sem eles não há avanço: Experiências com animais seguem imprescindíveis, ao contrário do que dizem ativistas**. São Paulo: Fapesp, 2008. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/2008/02/01/sem-eles-nao-ha-avanco/>. Acesso em: 23 ago. 2019

.

VIII SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA
Saúde única
IV MOSTRA ACADÊMICA

MEDICINA VETERINÁRIA E BIOTÉRIOS: INDISPENSÁVEIS À CIÊNCIA

WELLINGTON DA SILVA[1]; LETÍCIA DEAVANTIER KRÜGER[2]; TAÍS DA SILVA TEIXEIRA RECH[3] CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO[4]

BIOTÉRIOS
- CONCEITOS
- CLASSIFICAÇÕES
- COTIDIANO

\+

=

Experimentação animal

CIÊNCIA

Curso de Medicina Veterinária da UFPEL não possui componentes curriculares que abordem o tema.